

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 944**

51 Int. Cl.:

A61K 31/706	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)
C12N 9/10	(2006.01)
C12P 7/64	(2012.01)
A61K 9/20	(2006.01)
A61P 27/02	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)
C12N 15/113	(2010.01)
C12N 15/90	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2019 PCT/US2019/034289**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2019 WO19240946**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2019 E 19818852 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024 EP 3801465**

54 Título: **Vector vírico que codifica la proteína ELOVL2 para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad**

30 Prioridad:

11.06.2018 US 201862683292 P
09.08.2018 US 201862716554 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2024

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 5th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US

72 Inventor/es:

SKOWRONSKA-KRAWCZYK, DOROTA;
CHAO, DANIEL LEE y
CHEN, DANIEL

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 986 944 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vector vírico que codifica la proteína ELOVL2 para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad.

5 Esta solicitud reivindica los derechos de prioridad de las Solicitudes Provisionales de EE.UU. N.º 62/683.292 y 62/716.554, presentadas el 11 de junio de 2018 y el 9 de agosto de 2018, respectivamente, a cuyas solicitudes se hace referencia en el presente documento.

10 LISTA DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII y se hace referencia en el presente documento. Dicha copia ASCII, creada el 20 de mayo de 2019, se llama 24978-0488_SL.txt y tiene un tamaño de 17.271 bytes.

15 **Campo de la invención**

La presente invención se dirige a los campos de la oftalmología y la biología celular. Específicamente, la invención se refiere al tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y otras enfermedades oculares.

20 **Antecedentes**

Desde una perspectiva poblacional, la edad cronológica es posiblemente el rasgo biológico más importante para predecir los riesgos de enfermedades relacionadas con la edad, rendimiento físico y mental y mortalidad [1]. El uso de la edad cronológica se limita, sin embargo, a explicar la gran variación biológica entre individuos de una edad similar. La edad biológica es un concepto que intenta cuantificar diferentes estados de envejecimiento influenciados por el estilo de vida, la genética, la enfermedad y el medio ambiente. Las opciones medioambientales y de estilo de vida, como el tabaquismo y la dieta, también tienen implicaciones claras con respecto a las enfermedades asociadas a la edad [2]. Si bien los estudios epidemiológicos han logrado proporcionar evaluaciones cuantitativas de su impacto en la longevidad humana, los avances en biología molecular ofrecen ahora la capacidad de mirar más allá de las cuestiones poblacionales de mortalidad y centrarse en los efectos específicos de las enfermedades y otros factores sobre el envejecimiento dentro de organismos individuales.

Se ha desarrollado un modelo cuantitativo para el envejecimiento basado en patrones de metilación del ADN de todo el genoma mediante el uso de mediciones en 470.000 marcadores CpG de muestras de sangre completa de una gran cohorte de individuos humanos que abarcan un amplio intervalo de edad [3]. Este método es muy preciso para predecir la edad y también puede discriminar factores relevantes en el envejecimiento, incluyendo género, variantes genéticas y enfermedades [3, 4]. El modelo funciona en múltiples tejidos, sugiriendo la posibilidad de un reloj molecular común, regulado en parte por cambios en el metiloma. Además, estos patrones de metilación están fuertemente correlacionados con la senescencia y el envejecimiento celular. Se observó que varios genes se metilaban progresivamente a medida que aumentaba la edad cronológica. *ELOVL2* (Similar a alargamiento de ácidos grasos de cadena muy larga 2, por sus siglas en inglés), en particular, muestra de manera muy confiable una metilación aumentada a medida que los seres humanos envejecen, como se revela mediante el modelo de envejecimiento [3].

45 *ELOVL2* codifica una proteína transmembrana implicada en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados largos (C22 y C24) ω 3 y ω 6 (VLC-PUFA) [5]. Específicamente, *ELOVL2* es capaz de convertir el ácido docosapentaenoico (DPA) (22:5n-3) en 24:5n-3, que es el precursor de 22:6n-3, ácido docosahexaenoico (DHA) [6]. El DHA es el principal ácido graso poliinsaturado (PUFA) en la retina y el cerebro. Su presencia en los fotorreceptores promueve la función saludable de la retina y protege contra el daño provocado por la luz brillante y el estrés oxidativo. La expresión baja de *ELOVL2* se ha relacionado con niveles bajos de DHA [7], que a su vez se ha asociado con la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), entre una serie de otras enfermedades degenerativas de la retina [8]. En general, los PUFA participan en funciones biológicas cruciales incluyendo la producción de energía, la modulación de la inflamación y el mantenimiento de la integridad de la membrana celular. Es por lo tanto posible que la metilación de *ELOVL2* juegue un papel en el proceso de envejecimiento a través de la regulación de diferentes rutas biológicas.

La AMD es una enfermedad degenerativa de la mácula, es la principal causa de ceguera entre las personas mayores en los países desarrollados. Es una enfermedad multifactorial que implica factores genéticos, factores ambientales y metabólicos, y actualmente no existe cura ni prevención efectiva para ella. Se han identificado varios genes como factores de riesgo, pero muchos aún son desconocidos. A medida que avanza la AMD, el centro de la visión se vuelve borroso y finalmente pueden desarrollarse puntos ciegos. La AMD se presenta en dos formas, AMD húmeda y AMD seca. En la AMD seca, que afecta aproximadamente al 90 % de los pacientes con AMD, la deposición focal de desechos acelulares polimorfos, llamados drusas, son normalmente las primeras características clínicas observadas de la enfermedad. *ELOVL4*, otra elongasa de ácido graso implicada en la síntesis de VLC-PUFA, está implicada en la distrofia macular de Stargardt, una forma juvenil de degeneración

macular que provoca pérdida de visión [9, 10].

La AMD se ha asociado al estrés oxidativo en la retina [11]. El estrés oxidativo puede provocar inflamación y contribuir al desarrollo de la activación de los macrófagos [12]. Se ha demostrado que los fosfolípidos oxidados son marcadores fiables del estrés oxidativo e inician la inflamación uniéndose al epitelio pigmentario de la retina (EPR) y a los macrófagos, activando cascadas inflamatorias posteriores [13]. También se han encontrado proteínas y lípidos modificados por oxidación en las drusas y la membrana de Bruch [14]. La fosfatidilcolina, un fosfolípido altamente enriquecido en la retina, contiene el grupo principal fosfocolina. El epitopo de oxidación de la fosfocolina puede ser reconocido por un anticuerpo natural contra la fosfocolina, TEPC-15 [15], y se ha demostrado que se colocaliza con drusas en el ojo humano con AMD [16]. HTRA1, una de las principales proteínas asociadas a la AMD, también se descubrió que se colocaliza con drusas en el ojo con AMD [17]. Además, varios componentes de la cascada del complemento, incluyendo fragmentos del complemento C3, C5 y el complejo de ataque a la membrana C5b-9 se han encontrado dentro de las drusas [18]. El documento WO 2006/124324 desvela composiciones terapéuticas que comprenden tetrametilpirazina o hidralazina para su uso en el tratamiento de la AMD. El documento WO 2011/097577 desvela composiciones terapéuticas que comprenden ácido valproico para su uso en el tratamiento de la AMD húmeda o seca. El documento US 2005/137124 desvela métodos y composiciones que comprenden derivados de urea, un AINE, un antimetabolito o un compuesto capaz de provocar la disolución no enzimática de la membrana hialoidea para su uso en el tratamiento de, entre otros, AMD. El documento US 2017/035794 desvela métodos y composiciones que comprenden un dinucleótido para su uso en el tratamiento de, entre otros, AMD. El documento US 2017/143848 desvela un método para la administración ocular de ARNm para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno ocular que incluye AMD. Sin embargo, las preparaciones que comprenden un vector vírico que codifica una proteína o un polipéptido ELOVL2 como una estrategia terapéutica alternativa no se describen ni se sugieren en los documentos de la técnica anterior mencionados anteriormente.

Se necesitan nuevos métodos de tratamiento de la degeneración macular asociada con la edad.

Sumario de la invención

La invención se define por las reivindicaciones. La invención proporciona una preparación que comprende un vector vírico que codifica una proteína o un polipéptido ELOVL2 para su uso en un método para seleccionar un paciente que necesita tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad y tratar la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) en el paciente, en donde el vector vírico es adecuado para la administración a un sujeto humano y en un excipiente adecuado para la administración a un sujeto humano.

Las realizaciones adicionales ventajosas de la invención son objeto de las reivindicaciones dependientes.

En realizaciones, la invención proporciona que la preparación esté formulada para administración oftálmica.

En realizaciones, la invención proporciona que la administración se realice por vía parenteral en el ojo.

En realizaciones, la invención proporciona métodos para tratar una enfermedad o afección ocular relacionada con la edad que comprende aumentar la expresión de *ELOVL2* en un paciente que lo necesita.

En realizaciones, la invención proporciona que la expresión aumente administrando al paciente que lo necesita una cantidad eficaz de ARNm de *ELOVL2* mediante suministro de virus adenoasociado.

En otras realizaciones la invención comprende administrar una cantidad eficaz de ARNm de *ELOVL2* a un sujeto que lo necesite mediante el suministro de virus adenoasociado.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1D muestran la expresión y la metilación de *ELOVL2* en células WI-38. La Figura 1A muestra la expresión de *ELOVL2* por qPCR en células WI-38 en PD35, 45, 55. Un mayor % de entrada indica una mayor metilación del ADN. (** $p < 0,005$ ANOVA, * $p < 0,05$, prueba de la t). La Figura 1B muestra el nivel de metilación en la región promotora de *ELOVL2* en células WI-38 mediante inmunoprecipitación de ADN metilado seguida de qPCR. Los cebadores amplifican la región que contiene marcadores CpG cg16867657, cg24724428 y cg21572722. La Figura 1C muestra la proliferación de células de atenuación génica de WI-38 y controles de atenuación génica de luciferasa medida por el área de superficie cubierta a lo largo del tiempo. La Figura 1D muestra el porcentaje de senescencia mediante tinción con beta-galactosidasa en células de atenuación génica WI-38. (n=3, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, prueba de la t).

Las Figuras 2A-2C muestran la manipulación de la metilación del ADN en células PD52 WI-38. La Figura 2A muestra la metilación del promotor de *ELOVL2* medida por MeDIP seguida de qPCR en células WI-38 no tratadas control y tratadas con 5-Aza-dc. La Figura 2B muestra la expresión de *ELOVL2* por qPCR en las células WI-38 control no tratadas y tratadas con 5-Aza-dc. La Figura 2C muestra el porcentaje de senescencia

mediante tinción con beta-galactosidasa en células WI-38 tratadas con 5-Aza-dc 2 μ M. (n=3, *p<0,05, prueba de la t).

5 Las Figuras 3A-3E muestran *ELOVL2* y la retina. La Figura 3A muestra la expresión de *ELOVL2* en la retina de ratón mediante qPCR en ratones de diferentes edades. La Figura 3B muestra la transferencia Western de *ELOVL2* en retinas de ratón de diferentes edades; asterisco: banda no específica. La Figura 3C muestra la metilación del promotor de *ELOVL2* en retinas de ratones de diferentes edades. La Figura 3D muestra la formación de imágenes de autofluorescencia de ratones de tipo silvestre a los 2, 6, 12 y 24 meses de edad. Debajo de las imágenes se muestran rastros ERG representativos de respuestas escotópicas. La Figura 3E muestra la respuesta escotópica en ratones de diferentes edades, mostrado a través de la amplitud de la onda b del ERG. (n=4, **p<0,005, ANOVA).

15 Las Figuras 4A-4E muestran fenotipos de retina en ratones de cambio de destino de *ELOVL2*. La Figura 4A muestra la estrategia mediada por CRISPR-Cas9 para cambiar la especificidad del sustrato de *ELOVL2*. La Figura 4A desvela las SEQ ID NO 17-20, respectivamente, en orden de aparición. La Figura 4B muestra imágenes de autofluorescencia del fondo de ojo de ratón con cambio de destino homocigoto y de tipo silvestre. Las respuestas del ERG escotópico se muestran en trazos debajo de las imágenes. La Figura 4C muestra la amplitud de la onda b escotópica de ERG en ratones con mutación de cambio de marco y de tipo silvestre de 6 meses. La Figura 4D muestra la inmunotinción de Htra1 y T-15 en retinas de ratones TS y C217W. Las flechas indican agregados similares a drusas. La Figura 4E muestra la cuantificación de agregados similares a drusas positivos para HTRA1 y T-15. (n=4, *p<0,05, **p<0,005, prueba de la t).

25 Las Figuras 5A-5D muestran la inyección de 5-Aza-dc en ojos de ratón. La Figura 5A muestra la metilación de *ELOVL2* por MeDIP en retinas de ratón después de inyección intraocular con PBS o 5-Aza-dc. La Figura 5B muestra la expresión de *ELOVL2* por qPCR en retinas de ratón después de inyección intraocular con PBS o 5-Aza-dc. La Figura 5C muestra la respuesta de ERG escotópica en ojos de ratón después de la inyección intraocular con PBS o 5-Aza-dc. La Figura 5D muestra la amplitud de la onda b escotópica de ERG. (n=4, *p<0,05, prueba de la t).

30 Las Figuras 6A-6E muestran características de envejecimiento de las células WI-38. La Figura 6A muestra la proliferación de células WI-38 medida por el área de superficie cubierta en las duplicaciones de población (PD) 35, 45, 55. La Figura 6B muestra el porcentaje de senescencia mediante tinción con beta-galactosidasa en células WI-38. La Figura 6C muestra imágenes representativas de la morfología celular y la tinción con beta-galactosidasa de células WI-38. La Figura 6D muestra imágenes representativas de la morfología celular y la tinción con beta-galactosidasa de células WI38 de atenuación génica de *ELOVL2*, en comparación con los controles de atenuación génica de luciferasa. La Figura 6E muestra la eficiencia de atenuación génica *ELOVL2* en células WI-38 mediante qPCR. (n=3, **p<0,005, prueba de la t).

40 Las Figuras 7A-7E muestran características de envejecimiento de las células IMR-90. La Figura 7A muestra la proliferación de células IMR-90 medida por el área de superficie cubierta en las duplicaciones de población (PD) 35, 45, 55. La Figura 7B muestra el porcentaje de senescencia mediante tinción con beta-galactosidasa en células IMR-90. La Figura 7C muestra la expresión de *ELOVL2* por qPCR en células IMR-90. La Figura 7D muestra la eficiencia de atenuación génica *ELOVL2* en células IMR-90 mediante qPCR. La Figura 7E muestra imágenes representativas de la morfología de atenuación génica de *ELOVL2* con control de atenuación génica de luciferasa en células IMR90. (n=3, *p<0,05, **p<0,005, prueba de la t).

50 Las Figuras 8A-8D muestran las características de envejecimiento de las retinas de ratones TS. La Figura 8A muestra imágenes de autofluorescencia de retinas de ratones TS a los 2 meses, 6 meses, 1 año y 2 años de edad. La Figura 8B muestra la respuesta escotópica de ERG en ratones TS a los 2 meses, 6 meses, 1 año y 2 años de edad. La Figura 8C muestra los potenciales oscilatorios de ERG en ratones de tipo silvestre de 3 meses y 2 años. La Figura 8D muestra una respuesta de parpadeo de 10 Hz de ERG en ratones de tipo silvestre de 3 meses y 2 años.

55 Figuras 9A-9B. La Figura 9A muestra una Retina MeDIP de ratón de ratones Ames. Un mayor % de entrada indica una mayor metilación del ADN. Y=3 meses TS, O=2 años TS, AY= 3 meses Ames, AO= 2 años Ames. La Figura 9B muestra una expresión de *ELOVL2* en ratones Ames mediante qPCR. (n=3, *p<0,05, **p<0,005, prueba de la t).

60 Las Figuras 10A-10E muestran unos ratones de cambio de destino *ELOVL2-ELOVL5*. La Figura 10A muestra una similitud de secuencia de aminoácidos de *ELOVL2* y *ELOVL5* entre ser humano y ratón. Las puntas de flecha rojas indican la mutación C217W marcada como diana. La Figura 10A desvela las SEQ ID NO 21-24, respectivamente, en orden de aparición. La Figura 10B muestra el sitio de escisión diana para CAS9. La Figura 10C muestra una secuencia de oligo de reparación *ELOVL2* (SEQ ID NO: 25). La Figura 10D muestra una alineación de secuencias de proteínas de TS y C217W. Las mutaciones están resaltadas en azul. La Figura 10D desvela las SEQ ID NO 26-29, respectivamente, en orden de aparición. La Figura 10E muestra un análisis inespecífico de ratones mutantes *ELOVL2*. La Figura 10E desvela las SEQ ID NO 30, 31, 30 y 32,

respectivamente, en orden de aparición.

Las Figuras 11A-11D muestran unas características de envejecimiento de las retinas de ratones C217W. La Figura 11A muestra imágenes de autofluorescencia de retinas de ratones TS frente a C217W a los 4 meses, 6 meses, 8 meses y 1 año de edad. La Figura 11B muestra la respuesta escotópica de ERG en ratones TS frente a C217W a los 4 meses, 6 meses y 8 meses de edad. La Figura 11C muestra potenciales oscilatorios de ERG en ratones de tipo silvestre y con mutación de desplazamiento del marco de lectura. La Figura 11D muestra una respuesta de parpadeo de 10 Hz del ERG en ratones de tipo silvestre y con mutación de desplazamiento del marco de lectura.

Las Figuras 12A-12D muestran una caracterización de agregados similares a drusas. La Figura 12A muestra una inmunotinción de Htra1, C3 y C5b-9 en retinas de ratones TS y C217W. Las flechas indican agregados similares a drusas. La Figura 12B muestra una cuantificación de agregados similares a drusas positivos para C3 y C5b-9. La Figura 12C muestra una inmunotinción de C3 y en retinas de ratón TS y C217W. Las flechas indican agregados similares a drusas. La Figura 12D muestra una cuantificación de agregados similares a drusas positivos para C3. (n=4, **p<0,005, prueba de la t).

La Figura 13 muestra una respuesta escotópica de ERG en ojos de ratón inyectados con PBS y 5-Aza-dc.

Descripción detallada

La invención se define por las reivindicaciones. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la habilidad de la técnica. Estas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía, tales como, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. (Sambrook *et al.*, 1989); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed., 1987); *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987 y actualizaciones periódicas); *PCR: The Polymerase Chain Reaction* (Mullis *et al.*, eds., 1994); *Remington, The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª ed., (Lippincott, Williams & Wilkins 2003) y *Remington, The Science and Practice of Pharmacy*, 22ª ed., (Pharmaceutical Press and Philadelphia College of Pharmacy at University of the Sciences 2012).

Cuando se introducen elementos de la presente invención o de la realización o realizaciones preferidas de la misma, los artículos "un/a", "uno/a", "el/la" y "dicho/a" pretenden significar que hay uno o más de los elementos. Las expresiones "que comprende", "que incluye" y "que tiene" pretenden ser inclusivas y significan a que puede haber elementos adicionales más allá de los elementos enumerados.

El término "y/o" cuando se usa en una lista de dos o más elementos, significa que cualquiera de los elementos enumerados puede emplearse solo o en combinación con uno o más de los elementos enumerados. Por ejemplo, la expresión "A y/o B" pretende significar uno o ambos de A y B, es decir, A solo, B solo o A y B en combinación. La expresión "A, B y/o C" pretende significar A solo, B solo, C solo, A y B en combinación, A y C en combinación, B y C en combinación o A, B y C en combinación.

Se entiende que los aspectos y las realizaciones de la invención descrita en el presente documento incluyen "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en" aspectos y realizaciones.

Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por comodidad y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible al alcance de la invención. En consecuencia, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha desvelado específicamente todos los posibles subintervalos así como los valores numéricos individuales comprendidos en dicho intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 presenta subintervalos desvelados específicamente tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como los números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo. Los valores o intervalos también pueden expresarse en el presente documento como "aproximadamente", desde "aproximadamente" un valor particular y/o hasta "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresen dichos valores o intervalos, otras realizaciones divulgadas incluyen el valor específico enumerado, desde un valor particular y/o hacia el otro valor particular. De forma similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor concreto forma otra realización. También se entenderá además que hay una serie de valores desvelados en el presente documento y que cada valor también se desvela en el presente documento como "aproximadamente" ese valor particular además del propio valor. En realizaciones, "aproximadamente" puede usarse para significar, por ejemplo, dentro del 10 % del valor indicado, dentro del 5 % del valor indicado o dentro del 2 % del valor indicado.

Como se usa en el presente documento, "paciente" o "sujeto" significa un sujeto humano o animal que será tratado.

Como se usa en el presente documento la expresión "composición farmacéutica" se refiere a composiciones

farmacéuticamente aceptables, en donde la composición comprende compuesto o compuestos de desmetilación y puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede ser una combinación.

5 Como se usa en el presente documento la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o incluido en la Farmacopea de los EE.UU., otras farmacopeas generalmente reconocidas además de otras formulaciones que sean seguras para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos y/o mamíferos no humanos.

10 Como se usa en el presente documento la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente, diluyente, conservante, solubilizante, emulsionante, adyuvante y/o vehículo con el que el compuesto o compuestos de desmetilación, se administra. Dichos portadores pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos. Los agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa también pueden ser un portador. Los expertos en la materia conocen métodos para producir composiciones en combinación con portadores. En algunas realizaciones, el lenguaje "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed., (Lippincott, Williams & Wilkins 2003). Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla dicho uso en las composiciones.

25 Como se usa en el presente documento, "terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de compuesto o compuestos de desmetilación que es suficiente para tratar o mejorar, o de alguna manera reducir los síntomas asociados a enfermedades oculares relacionadas con la edad, tales como pero no limitado a la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). Cuando se usa con referencia a un método, el método es suficientemente eficaz para tratar o mejorar, o de alguna manera reducir los síntomas asociados a enfermedades oculares relacionadas con la edad. Por ejemplo, una cantidad eficaz en referencia a enfermedades oculares relacionadas con la edad es aquella cantidad que es suficiente para bloquear o prevenir su aparición; o si la patología de la enfermedad ha comenzado, paliar, mejorar, estabilizar, revertir o retardar la progresión de la enfermedad, o reducir de otro modo las consecuencias patológicas de la enfermedad. En cualquier caso, puede administrarse una cantidad eficaz en dosis únicas o divididas.

40 Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" abarca al menos una mejora de los síntomas asociados a enfermedades oculares relacionadas con la edad en el paciente, donde mejora se usa en un sentido amplio para referirse al menos a una reducción en la magnitud de un parámetro, por ejemplo, un síntoma asociado a la enfermedad o la afección que se está tratando. Como tal, "tratamiento" también incluye situaciones en que la enfermedad, el trastorno o la afección patológica, o al menos síntomas asociados a los mismos, se inhiben completamente (por ejemplo, se impide que ocurran) o se detienen (por ejemplo, se terminan) de tal manera que el paciente ya no padece la afección, o al menos los síntomas que caracterizan la afección.

45 El término "combinación" se refiere a una combinación fija en una forma de dosificación unitaria o a un kit de partes para la administración combinada donde uno o más compuestos de desmetilación y un compañero de combinación (por ejemplo, otro fármaco como se explica a continuación, también denominado "agente terapéutico" o "coagente") pueden administrarse de forma independiente al mismo tiempo o por separado dentro de intervalos de tiempo. En algunas circunstancias, los compañeros de combinación muestran un efecto cooperativo, por ejemplo, sinérgico.

50 El término "coadministración" o la expresión "administración combinada" o similares como se utilizan en el presente documento pretenden abarcar la administración del compañero de combinación seleccionado a un único sujeto que lo necesita (por ejemplo, un paciente), y pretenden incluir regímenes de tratamiento en que los agentes no se administran necesariamente por la misma vía de administración o al mismo tiempo. La expresión "combinación farmacéutica" como se usa en el presente documento significa un producto que resulta de la mezcla o la combinación de más de un principio activo e incluye combinaciones tanto fijas como no fijas de los principios activos. La expresión "combinación fija" significa que los principios activos, por ejemplo, un compuesto y un compañero de combinación, se administran ambos a un paciente simultáneamente en forma de una única entidad o dosis. La expresión "combinación no fija" significa que los principios activos, por ejemplo, un compuesto y un compañero de combinación, se administran ambos a un paciente como entidades separadas, ya sea simultáneamente, al mismo tiempo o secuencialmente sin límites de tiempo específicos, en donde dicha administración proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los dos compuestos en el cuerpo del paciente. Esto último también se aplica a la terapia de cóctel, por ejemplo, la administración de tres o más principios activos.

65 La degeneración macular es un término clínico que se usa para describir una familia de enfermedades que se caracterizan por una pérdida progresiva de la visión central asociada a anomalías de la membrana de Bruch, la coroides, la retina neural y/o el epitelio pigmentario de la retina. En el centro de la retina se encuentra la mácula

lútea, que es aproximadamente $\frac{1}{3}$ a $\frac{1}{2}$ cm en diámetro. La mácula proporciona una visión detallada, particularmente en el centro (la fovea), porque los conos tienen mayor densidad. Los vasos sanguíneos, las células ganglionares, la capa nuclear interna y las células, y las capas plexiformes están todas desplazadas hacia un lado (en lugar de descansar sobre ellas), permitiendo así que la luz tenga un camino más directo hacia los conos.

5 Debajo de la retina está la coroides, una colección de vasos sanguíneos incrustados dentro de un tejido fibroso y el epitelio pigmentado (PE), que se superpone a la capa coroidea. Los vasos sanguíneos coroides proporcionan nutrición a la retina (particularmente a sus células visuales). La coroides y el PE se encuentran en la parte posterior del ojo.

10 La degeneración macular relacionada con la edad (AMD), la degeneración macular más prevalente, se asocia a pérdida progresiva de agudeza visual en la porción central del campo visual, cambios en la visión del color y adaptación y sensibilidad anormales a la oscuridad. Se han descrito dos manifestaciones clínicas principales de la AMD: la forma seca o atrófica y la forma húmeda o exudativa. La forma seca se asocia a muerte celular atrófica de la retina central o mácula, que es necesaria para la visión fina usada para actividades tales como leer, conducir
15 o reconocer rostros. Aproximadamente el 10-20 % de estos pacientes con AMD seca progresan a la segunda forma de AMD, conocida como AMD húmeda.

La AMD húmeda (neovascular/exudativa) está provocada por un crecimiento anormal de vasos sanguíneos detrás de la retina debajo de la mácula y fuga vascular, provocando un desplazamiento de la retina, hemorragia y formación de cicatrices. Esto da como resultado un deterioro de la vista durante un período de meses a años. Sin embargo, los pacientes pueden sufrir una rápida pérdida de visión. Todos los casos de AMD húmeda se originan en una AMD seca avanzada. La forma húmeda representa el 85 % de las cegueras debidas a la AMD. En la AMD húmeda, a medida que los vasos sanguíneos pierden líquido y sangre, se forma tejido cicatricial que destruye la retina central.

25 El glaucoma es una de las principales causas de ceguera. Aunque el término "glaucoma" se aplica a una gran cantidad de trastornos del ojo diferentes, es común a todos los tipos de glaucoma el fenómeno en que la presión dentro del ojo aumenta con la consiguiente destrucción del nervio óptico. En la mayoría de las formas de glaucoma, el individuo no detecta la elevación de la presión, tal como por dolor o reducción de la agudeza visual hasta que se haya producido una pérdida significativa de la visión. En el ojo sano, el líquido (humor acuoso) pasa desde la cámara anterior a través de una masa de tejido similar a un filtro (la red trabecular) y de allí a una serie conectada de venas en la esclerótica. En la forma de glaucoma más común (glaucoma de ángulo abierto), la elevación de la presión se debe a un bloqueo de la vía de salida a través de la red trabecular. Los métodos para tratar el glaucoma han adoptado dos formas generales, en concreto medicación y cirugía.

35 La diabetes es la cuarta causa de muerte y afecta a casi 16 millones de estadounidenses, un tercio de ellos sin diagnosticar, costando más de 100 mil millones de dólares al año, el 15 % de los dólares estadounidenses destinados a la atención sanitaria. Cada año se desarrollan unos 800.000 nuevos casos de diabetes. Para el año 2030, el número podría llegar a 50 millones allí y al menos 300 millones en todo el mundo. La diabetes mellitus es la principal causa de nueva ceguera entre personas de 20 a 74 años en los Estados Unidos. La retinopatía comienza a desarrollarse poco después del diagnóstico de diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM, por sus siglas en inglés) y después de 15 años, la prevalencia es casi del 100 %. Un millón de personas en los EE.UU. tienen IDDM o diabetes tipo I. En la diabetes no insulino dependiente (NIDDM, por sus siglas en inglés) o diabetes tipo II, actualmente 15 millones, aproximadamente el 21 % de los pacientes tienen retinopatía en el momento del diagnóstico y el 60 % después de 20 años. Los diabéticos tipo II se han triplicado en los últimos 30 años y afectan a la mitad de los estadounidenses mayores de 65 años. La retinopatía proliferativa se produce en el 10-20 % de la NIDDM. Brechner R J, et al, JAMA 1993;270:1714-1718.

50 La degeneración macular o degeneración macular relacionada con la edad (AMD), afecta la parte central de la retina y es la principal causa de ceguera en personas mayores de 65 años en los EE.UU. La AMD afecta a 13 millones de personas y provoca discapacidad en aproximadamente 1,2 millones. Aproximadamente el 30 % de los pacientes mayores de 75 años padecen AMD y el 23 % del resto la desarrollarán en un plazo de cinco años. La prevalencia de AMD aumenta con la edad desde el 16,8 % en pacientes de 55-64 años hasta el 25,6 % en pacientes de 65-74 años y hasta el 42 % en pacientes mayores de 75 años. Actualmente no se conoce ninguna cura para la AMD seca o atrófica, la forma caracterizada por drusas duras o blandas (depósitos de restos celulares), cambios en el epitelio pigmentario de la retina (EPR), o atrofia de los fotorreceptores y del EPR. Esta forma representa aproximadamente el 90 % de todos los casos. El resto de los casos de AMD tienen la forma "húmeda" caracterizada por neovascularización y exudación. Pratt S G, Review of Ophthalmology agosto de 1998:42-50.

60 En el presente documento se describen agentes de desmetilación para el tratamiento de afecciones o enfermedades oculares relacionadas, tales como degeneración macular relacionada con la edad (AMD), retinopatía diabética, angiogénesis ocular (tal como la neovascularización ocular que afecta a la coroides, el tejido corneal o retiniano) y otras afecciones oculares que implican la metilación de genes, tales como *ELOVL2*. El tratamiento de la AMD incluye tanto la forma seca como la húmeda.

65 La divulgación proporciona un método para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección ocular relacionada

con la edad que comprende administrar una cantidad eficaz de al menos un agente de desmetilación a un sujeto que necesita tratamiento.

5 Las referencias a métodos para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o una afección ocular relacionada con la edad en la descripción deben interpretarse como referencias a las preparaciones de la presente invención para su uso en esos métodos.

10 La presente divulgación proporciona que el agente de desmetilación pueda aumentar la expresión del alargamiento del gen 2 similar a los ácidos grasos de cadena muy larga (*ELOVL2*) y/o aumentar el nivel de la enzima *ELOVL2* y/o aumentar el nivel de retina 22:6(n-3) docosahexaenoico (DHA) y 22:5(n-6), ácido docosapentaenoico (DPA).

La presente divulgación proporciona que el agente de desmetilación pueda seleccionarse de 5-azacitidina, decitabina, zebularina, procainamida, procaína, hidralazina, ácido valproico y galato de epigallocatequina (EGCG).

15 La presente divulgación proporciona que el agente desmetilante pueda administrarse al ojo mediante una vía intravítrea, subretiniana, subconjuntival, subtenoniana o yuxtaescleral posterior.

20 La presente invención proporciona que la enfermedad ocular relacionada con la edad sea la degeneración macular relacionada con la edad (AMD).

La presente divulgación proporciona que el agente desmetilante pueda administrarse como una formulación de liberación prolongada.

25 En realizaciones, la presente invención proporciona una preparación como se define en la reivindicación 1 para su uso en un método para tratar una enfermedad o afección ocular relacionada con la edad que comprende aumentar la enzima *ELOVL2* y/o el nivel de 22:6(n-3)docosahexaenoico (DHA) y 22:5(n-6) ácido docosapentaenoico (DPA) en el ojo mediante la administración de una cantidad eficaz de ARNm que codifica *ELOVL2* en el ojo; en donde el ARNm se administra usando un vector vírico, como se define con más detalle en la reivindicación 1.

30 En realizaciones, la presente invención proporciona que el vector vírico se seleccione de un vector adenovírico, un vector de virus adenoasociado, un vector lentivírico, un vector del virus vaccinia y un vector retrovírico.

35 La presente divulgación proporciona que el ARNm pueda administrarse usando un vector no vírico tal como un liposoma o una micro/nanopartícula.

En realizaciones, la presente invención proporciona que el vector vírico se administre al ojo mediante una vía intravítrea, subretiniana, subconjuntival, subtenoniana o yuxtaescleral posterior.

40 La presente invención proporciona que la enfermedad ocular relacionada con la edad sea la degeneración macular relacionada con la edad (AMD).

45 De acuerdo con la invención, una preparación que comprende un vector vírico que codifica una proteína o un polipéptido *ELOVL2* para su uso en un método para tratar, la degeneración macular relacionada con la edad que comprende aumentar la enzima *ELOVL2* en el ojo y/o el nivel de ácido docosahexaenoico (DHA) 22:6(n-3) y 22:5(n-6) docosapentaenoico (DPA) en el ojo mediante terapia génica usando un vector de expresión de *ELOVL2*, en donde el vector de expresión de *ELOVL2* es un vector vírico adecuado para la administración a un sujeto humano y en un excipiente adecuado para la administración a un sujeto humano.

50 En realizaciones, la presente invención proporciona que el vector vírico se seleccione de un vector adenovírico, un vector de virus adenoasociado, un vector lentivírico, un vector del virus vaccinia y un vector retrovírico.

En realizaciones, la presente invención proporciona que el *ELOVL2* El vector de expresión se administra por una vía intravítrea, subretiniana, subconjuntival, subtenoniana o yuxtaescleral posterior.

55 En realizaciones, la presente invención proporciona que la enfermedad ocular relacionada con la edad sea la degeneración macular relacionada con la edad (AMD); y en donde la enfermedad ocular relacionada con la edad puede ser AMD seca.

60 En realizaciones, la presente invención proporciona una preparación que comprende un vector vírico que codifica una proteína o un polipéptido *ELOVL2* para su uso en un método que comprende seleccionar un paciente que necesita tratamiento de una enfermedad ocular relacionada con la edad y administrar una cantidad eficaz de un vector de expresión de *ELOVL2* al ojo del paciente mediante el cual se trata la enfermedad relacionada con la edad, en donde el vector vírico es adecuado para la administración a un sujeto humano y en un excipiente adecuado para la administración a un sujeto humano.

65 En realizaciones, la presente invención proporciona que el paciente se seleccione determinando la metilación de

ELOVL2 y/o la expresión de *ELOVL2* en el ojo del paciente.

La presente divulgación proporciona que el agente desmetilante puede ser decitabina.

5 En realizaciones, la presente invención proporciona que la enfermedad ocular relacionada con la edad sea la degeneración macular relacionada con la edad (AMD); y en donde la enfermedad ocular relacionada con la edad puede ser AMD seca.

10 En realizaciones, la presente invención proporciona un vector vírico que codifica una proteína o un polipéptido *ELOVL2* para su uso en un método que comprende el uso de ARNm que codifica *ELOVL2* en el tratamiento de una enfermedad ocular relacionada con la edad, opcionalmente AMD seca.

15 En realizaciones, la presente invención proporciona un vector de expresión de *ELOVL2* para su uso en el tratamiento de una degeneración macular relacionada con la edad, opcionalmente AMD seca.

En realizaciones, la presente divulgación proporciona una formulación que contiene una concentración de un agente desmetilante enumerado de tal manera que la administración intravítrea de 1 ul - 100 ul constituye una cantidad eficaz de entre 5 ng - 500 ng.

20 La presente divulgación proporciona una formulación que contiene una concentración de un agente desmetilante enumerado de tal manera que la administración intravítrea 1 ul - 100 ul constituye una cantidad eficaz de entre 500 ng - 1.500 ng.

25 La presente divulgación proporciona una formulación que contiene una concentración de un agente desmetilante enumerado de tal manera que la administración intravítrea 1 ul - 100 ul constituye una cantidad eficaz de entre 1.500 ng - 4.500 ng.

30 En realizaciones, la presente invención prevé que la preparación sea sustancialmente acuosa. En realizaciones, la presente invención proporciona que la preparación sea una sustancialmente anhidra. La presente divulgación proporciona que las formulaciones sean de liberación inmediata y/o de liberación prolongada.

La presente divulgación proporciona que el agente desmetilante sea decitabina.

35 La presente divulgación proporciona un método para preparar un medicamento para administración.

40 Salvo que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos y cualquier acrónimo usado en el presente documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la materia en el campo de la invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para poner en práctica la presente invención, los métodos, los dispositivos y los materiales ilustrativos se describen en el presente documento.

45 Como se usa en el presente documento, y a menos que se especifique lo contrario, los términos "prevenir", "previniendo" y "prevención" se refieren a la prevención de la aparición, la recurrencia o la propagación de una enfermedad o trastorno, o de uno o más síntomas del mismo. Los términos pueden referirse al tratamiento o la administración de un compuesto o una forma farmacéutica proporcionados en el presente documento, con o sin uno o más principio o principios activos adicionales, antes de la aparición de los síntomas, particularmente a sujetos en riesgo de enfermedad o trastornos proporcionados en el presente documento. Los términos abarcan la inhibición o la reducción de un síntoma de la enfermedad particular. En determinadas realizaciones, los sujetos con antecedentes familiares de una enfermedad son candidatos potenciales para regímenes preventivos. En determinadas realizaciones, los sujetos que tienen antecedentes de síntomas recurrentes también son candidatos potenciales para la prevención. A este respecto, el término "prevención" puede usarse indistintamente con la expresión "tratamiento profiláctico".

50 Como se usa en el presente documento, y a menos que se especifique lo contrario, una "cantidad profilácticamente eficaz" de un compuesto es una cantidad suficiente para prevenir una enfermedad o un trastorno, o prevenir su recurrencia. Una cantidad profilácticamente eficaz de un compuesto significa una cantidad de agente terapéutico, solo o en combinación con uno o más agente o agentes distintos, que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de la enfermedad. La expresión "cantidad profilácticamente eficaz" puede abarcar una cantidad que mejora la profilaxis general o potencia la eficacia profiláctica de otro agente profiláctico. Como se usa en el presente documento, y a menos que se especifique lo contrario, el término "sujeto" se define en el presente documento que incluye animales tales como mamíferos, incluyendo, pero no limitado a, primates (por ejemplo, seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejo, ratas, ratones y similares. De acuerdo con la invención, el sujeto es un ser humano. Los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento en referencia, por ejemplo, a un sujeto mamífero, tal como un ser humano. En realizaciones particulares, un sujeto que tiene AMD es un sujeto al que previamente se le ha diagnosticado degeneración macular relacionada con la edad.

Como se usa en el presente documento, y a menos que se especifique lo contrario, un compuesto descrito en el presente documento pretende abarcar todos los estereoisómeros posibles, a menos que se especifique una estereoquímica particular. Cuando los isómeros estructurales de un compuesto son interconvertibles a través de una barrera de baja energía, el compuesto puede existir como un único tautómero o una mezcla de tautómeros. Esto puede tomar la forma de tautomerismo de protones; o el llamado tautomerismo de valencia en el compuesto, por ejemplo, que contienen una fracción aromática.

Como se usa en el presente documento, y a menos que se especifique lo contrario, un análogo, tal como citidina, mencionado en el presente documento pretende abarcar la base libre del análogo de citidina, o una sal, solvato, hidrato, cocrystal, complejo, profármaco, precursor, metabolito y/o derivado del mismo. Un análogo de citidina al que se hace referencia en el presente documento puede abarcar la base libre del análogo de citidina, o una sal, solvato, hidrato, cocrystal o complejo del mismo. Un análogo de citidina al que se hace referencia en el presente documento puede abarcar la base libre del análogo de citidina, o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable.

Esta divulgación presenta el uso de agentes para desmetilar el promotor de *ELOVL2*, para inducir la expresión del gen y mejorar la función visual de un mamífero, usando determinados compuestos tales como 5-Azacitidina, Decitabina, Zebularina, Procainamida, Procaína, Procaina, Galato de epigallocatequina, Ácido valproico, Hidralazina y compuestos y derivados similares. En conjunto estos se describen en el presente documento como un "Agente de desmetilación".

El agente de desmetilación puede inyectarse por vía intraocular, por ejemplo, mediante inyección subconjuntival, intravítrea, subretiniana o retrobulbar. Para inyección subconjuntival, puede usarse una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 500 µg/ml. Para inyección intravítrea, puede usarse una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 µg/0,1 ml a aproximadamente 1000 µg/0,1 ml; una concentración que puede usarse es de aproximadamente 50 µg/0,1 ml. Para inyección subretiniana, puede usarse una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 µg/0,1 ml a aproximadamente 100 µg/0,1 ml. Para inyección retrobulbar, puede usarse una concentración en el intervalo de aproximadamente 20 µg/ml a aproximadamente 1000 µg/ml. El agente de desmetilación puede administrarse en una solución de base acuosa, por ejemplo, unido a liposomas, o puede disolverse en un disolvente orgánico. El agente de desmetilación también puede proporcionarse en un vehículo inerte fisiológicamente aceptable tal como una microesfera, liposoma, cápsula o matriz polimérica mediante inyección o implantación quirúrgica en el ojo o sobre el ojo. Los disolventes acuosos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, solución salina al 0,9 % y dextrosa al 5 %. Los disolventes orgánicos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, dimetilsulfóxido (DMSO) o un alcohol. Un implante puede proporcionar una forma de liberación prolongada del agente de desmetilación para lograr una dosis constante de fármaco. También se desvela un método para reducir la aparición o la progresión de la retinopatía diabética, la degeneración macular relacionada con la edad y/o la retinitis pigmentaria, administrando intraocularmente una composición que contiene Agente de desmetilación, ya sea solo o con otros compuestos relacionados con el Agente de desmetilación, como el principio activo en una formulación farmacéuticamente aceptable y en una cantidad eficaz sin provocar toxicidad sustancial. La composición puede contener el Agente de desmetilación como único principio activo, siendo los otros agentes aquellos que no afectan materialmente las propiedades básicas del agente de desmetilación. Como alternativa, la composición puede contener otros principios activos, aparte del Agente de desmetilación. La composición puede inyectarse o implantarse en el ojo. La divulgación abarca un método para tratar a un paciente mediante la administración intraocular de una composición que contiene un Agente de desmetilación como el principio activo en una formulación farmacéuticamente aceptable y en una cantidad eficaz para tratar la degeneración macular, la retinopatía o la retinitis pigmentosa sin toxicidad ocular sustancial. La composición se inyecta o se implanta en el ojo y puede administrarse en una formulación de liberación prolongada. Una formulación de liberación sostenida, tal como una matriz, puede estar cargada con una cantidad de agente de desmetilación que puede ser tóxico si se libera a un ritmo no controlado, o una cantidad supraterapéutica, pero que está formulado para liberar una cantidad terapéutica no tóxica de agente de desmetilación durante un período de tiempo. Por ejemplo, una matriz puede contener de aproximadamente 1 microgramo a más de 10 microgramos del Agente de desmetilación y puede liberar de manera sostenida una dosis de mantenimiento no tóxica del Agente de desmetilación. Dicha matriz puede ser un depósito con paredes difusas y puede ser lipídica, de alcohol polivinílico, de acetato de polivinilo, de policaprolactona, de ácido poli(glicólico) y/o de ácido poli(láctico).

El agente de desmetilación puede inyectarse por vía intraocular usando inyección intravítrea (en el vítreo), subconjuntival (en la subconjuntiva), inyección subretiniana (debajo de la retina) o retrobulbar (detrás del globo ocular). Para inyección subconjuntival, puede usarse una concentración de Agente de desmetilación en el intervalo de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 500 µg/ml. Para inyección intravítrea, puede usarse una concentración de Agente de desmetilación en el intervalo de aproximadamente 10,0 ng/0,1 ml a aproximadamente 1000 µg/0,1 ml. Para inyección retrobulbar, puede usarse una concentración de Agente de desmetilación en el intervalo de aproximadamente 20 µg/ml a aproximadamente 1000 µg/ml. Para inyección subretiniana, puede usarse una concentración de Agente de desmetilación en el intervalo de aproximadamente 1 µg/0,1 ml a aproximadamente 100 µg/0,1 ml. Sin embargo estas dosis pertenecen a formulaciones de liberación inmediata y

se requerirían concentraciones más altas de Agente de desmetilación para formulaciones de liberación más prolongada. El Agente de desmetilación puede administrarse por vía intraocular en una composición en la que sea el único principio activo. Como alternativa, el Agente de desmetilación puede administrarse por vía intraocular en una composición con compuestos relacionados. Los compuestos relacionados pueden incluir inmunosupresores que incluyen, pero no se limitan a, tacrolimus, ciclofosfamida, sirolimus, atópósido, tioeapa, metotrexato, azatioprina (imiran), interferones, infliximab, etanercept, micofenolato de mofetilo, 15-desoxispergualina, talidomida, latirámoro, leflunomida, vincristina, citarabina, etc. La composición que contiene el agente de desmetilación puede administrarse en una cantidad o a una dosis que no produzca una toxicidad sustancial para los ojos. Como se usa en el presente documento, una falta de toxicidad sustancial abarca tanto la ausencia de cualquier manifestación de toxicidad, así como manifestaciones de toxicidad que un experto en la materia consideraría no suficientemente perjudiciales como para disminuir o suspender el tratamiento. La forma de solución intravenosa del agente de desmetilación puede diluirse para lograr la concentración indicada usando NaCl al 0,9 % o dextrosa al 5 %, o un disolvente orgánico tal como dimetilsulfóxido (DMSO) o alcohol. La administración intraocular puede ser por cualquiera de las vías y formulaciones descritas anteriormente. Para la inyección, cualquiera de una solución, emulsión, suspensión, formulación capsular de microesferas o liposomas, etc. pueden usarse. El agente de desmetilación puede administrarse quirúrgicamente como un implante ocular. Como un ejemplo, puede implantarse en o sobre la esclerótica un recipiente reservorio que tenga una pared difusible de alcohol polivinílico o acetato de polivinilo y que contenga cantidades en miligramos de Agente de desmetilación. Como otro ejemplo, el Agente de desmetilación puede incorporarse en cantidades de miligramos en una matriz polimérica que tiene unas dimensiones de aproximadamente 2 mm por 4 mm y está hecha de un polímero tal como policaprolactona, ácido poli(glicólico), ácido poli(láctico) o un polianhídrido, o un lípido tal como ácido sebáico, y puede implantarse en la esclerótica o en el ojo. Esto generalmente se logra cuando el paciente recibe un anestésico tópico o local y se realiza una pequeña incisión (3-4 mm) detrás de la córnea. La matriz, que contiene Agente de desmetilación, se inserta a continuación a través de la incisión y se sutura a la esclerótica usando nailon 9-0. El agente de desmetilación puede estar contenido dentro de una matriz inerte para inyección en el ojo. Como un ejemplo de una matriz inerte, pueden prepararse liposomas a partir de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), tales como fosfatidilcolina (PC) de huevo, un lípido que tiene una transición de calor baja. Los liposomas se elaboran usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia. El Agente de desmetilación, en cantidades que varían de nanogramos a cantidades de microgramos y miligramos, se añade a una solución de PC de huevo y el fármaco lipófilo se une al liposoma. Puede implantarse intraocularmente un sistema de administración de fármacos de liberación prolongada para dar como resultado una liberación sostenida del principio activo durante un período de tiempo. La estructura implantable puede tener la forma de una cápsula de cualquiera de los polímeros desvelados anteriormente (por ejemplo, de policaprolactona, ácido poli(glicólico), ácido poli(láctico), polianhídrido) o lípidos que pueden formularse como microesferas. Como un ejemplo ilustrativo, el Agente de desmetilación puede mezclarse con alcohol polivinílico (PVA), después de la mezcla se seca y se recubre con acetato de etilenvinilo, a continuación se enfría nuevamente con PVA. En una formulación para inyección intraocular, la cápsula de liposoma se degrada debido a la digestión celular y puede ser un sistema de administración de fármacos de liberación lenta, permitiendo al paciente una exposición constante al fármaco a lo largo del tiempo. En una formulación de liberación prolongada, la microesfera, cápsula, liposoma, etc. pueden contener una concentración de Agente de desmetilación que podría ser tóxica si se administrara en forma de embolada. La administración de liberación prolongada, sin embargo, está formulada de tal manera que la concentración liberada durante cualquier período de tiempo no exceda una cantidad tóxica. Esto se logra, por ejemplo, a través de diversas formulaciones del vehículo (microesfera recubierta o no recubierta, cápsula recubierta o no recubierta, componentes lipídicos o poliméricos, estructura unilaminar o multilaminar, y combinaciones de las anteriores, etc.). Otras variables pueden incluir los parámetros farmacocinéticos-farmacodinámicos del paciente (por ejemplo, masa corporal, género, tasa de aclaramiento plasmático, función hepática, etc.). Dependiendo de la cantidad de Agente de desmetilación proporcionada en la formulación, un paciente podría recibir dosis durante un periodo de años a partir de un solo implante o inyección. Como ejemplos ilustrativos pero no limitantes, una cápsula puede cargarse 1 -2 mg de Agente de desmetilación; si la cápsula está formulada para liberar unos pocos microgramos de fármaco por día, el paciente podría recibir la dosis durante aproximadamente 1.000 días, o casi tres años. Como otro ejemplo, si la cápsula está cargada con 5 mg de medicamento, el paciente podría recibir dosis durante aproximadamente quince años. Esta formulación proporciona beneficios que incluyen una dosificación precisa con mayor comodidad para el paciente, porque en algunos casos la intervención solo se requiere una o dos veces por década o incluso con menos frecuencia. La formación y la carga de microesferas, microcápsulas, liposomas, etc. y su implantación ocular son técnicas estándar conocidas por un experto en la materia, por ejemplo, el uso de un implante de liberación sostenida de ganciclovir para tratar la retinitis por citomegalovirus, desvelado en *Vitreoretinal Surgical Techniques*, Peyman *et al.*, Eds. (Martin Dunitz. Londres 2001, capítulo 45); *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, Wise, Ed. (Marcel Dekker, Nueva York 2000), cuyas secciones pertinentes se mencionan en el presente documento. El Agente de desmetilación, ya sea solo o en combinación con otros agentes, puede administrarse por vía intraocular y sin toxicidad sustancial, para tratar la retinopatía tal como ocurre en pacientes diabéticos, degeneración macular y retinitis pigmentosa, usando los métodos y las formulaciones descritos anteriormente.

En el presente documento se proporcionan métodos para tratar una enfermedad ocular, incluyendo AMD, usando un análogo de citidina de una sal, solvato, hidrato, precursor y/o derivado del mismo. Algunos de los métodos proporcionados en el presente documento comprenden tratar una enfermedad ocular usando una combinación de dos o más principios activos, incluyendo 5-azacitidina.

- Los análogos de nucleósidos se han probado clínicamente para el tratamiento de determinados cánceres, pero no para enfermedades oculares. Los análogos de nucleósidos 5-azacitidina (también conocidos como 4-amino-1-β-D-ribofuranosil-1,3,5-triazin-2(1H)-ona; Designación de Centro Nacional de Servicios NSC- 102816; Número de Registro CAS 320-67-2; azacitidina; Aza y AZA; y actualmente comercializado como VIDAZA®) y 2'-desoxi-5-azacitidina (también conocida como 5-aza-2'-desoxicitidina, decitabina, Dae y DAC, y actualmente comercializado como DACOGEN®) son inhibidores de la ADN metiltransferasa (DNMT) que han sido aprobados por la Food and Drug Administration de EE.UU. para el tratamiento de los síndromes mielodisplásicos (MDS). La azacitidina y la decitabina son análogos de la citidina; una diferencia estructural entre estos análogos de citidina y sus nucleósidos naturales relacionados es la presencia de un nitrógeno en la posición 5 del anillo de citosina en lugar de un carbono. Puede definirse que la azacitidina tiene una fórmula molecular de C₈H₁₂N₄O₅, un peso molecular de 244,21 gramos por mol y una estructura como se muestra a continuación. Puede definirse que la decitabina tiene una fórmula molecular de C₈H₁₂N₄O₄ y un peso molecular de 228,21 gramos por mol.
- Los métodos proporcionados en el presente documento pueden comprender la administración o la coadministración de uno o más análogos de citidina. El análogo de citidina puede ser 5-azacitidina (azacitidina). El análogo de citidina puede ser 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina). El análogo de citidina puede ser 5-azacitidina (azacitidina) o 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina). El análogo de citidina es, por ejemplo: 1-β-D-Arabinofuranosilcitosina (Citarabina o ara-C); pseudoisocitidina (psi ICR); 5-fluoro-2'-desoxicitidina (FCdR); 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (Gemcitabina); 5-aza-2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina; 5-aza-2'-desoxi-2'-fluorocitidina; 1-β-D-ribofuranosil-2(1H)-pirimidinona (Zebularine); 2',3'-didesoxi-5-fluoro-3'-tiacitidina (Emtriva); 2'-ciclocitidina (Ancitabina); 1-β-D-arabinofuranosil-5-azacitosina (fazarabina o ara-AC); 6-azacitidina (6-aza-CR); 5,6-dihidro-5-azacitidina (dH-aza-CR); N4-pentiloxi-carbonil-5'-desoxi-5-fluorocitidina (Capecitabina); N4-octadecil-citarabina; o citarabina de ácido elaídico. Los análogos de citidina proporcionados en el presente documento incluyen cualquier compuesto que pueda estar estructuralmente relacionado con citidina o desoxicitidina y funcionalmente imite y/o antagonice la acción de citidina o desoxicitidina.

En el presente documento se proporcionan sales, cocrystalos, solvatos (por ejemplo, hidratos), complejos, profármacos, precursores, metabolitos y/u otros derivados de los análogos de citidina proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan sales, cocrystalos, solvatos (por ejemplo, hidratos), complejos, precursores, metabolitos y/u otros derivados de 5-azacitidina. En el presente documento se proporcionan sales, cocrystalos y/o solvatos (por ejemplo, hidratos) de los análogos de citidina proporcionados en el presente documento. En el presente documento se proporcionan sales y/o solvatos (por ejemplo, hidratos) de los análogos de citidina proporcionados en el presente documento. En el presente documento se proporcionan análogos de citidina que no son sales, cocrystalos, solvatos (por ejemplo, hidratos) o complejos de los análogos de citidina proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, se proporciona en el presente documento 5-azacitidina en una forma no ionizada, no solvatada (por ejemplo, anhídrida) no complejada. En el presente documento se proporciona una mezcla de dos o más análogos de citidina proporcionados en el presente documento. Los análogos de citidina proporcionados en el presente documento pueden prepararse usando métodos y procedimientos sintéticos a los que se hace referencia en el presente documento o disponibles de otro modo en la bibliografía. Por ejemplo, se describen métodos particulares para sintetizar 5-azacitidina, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 7.038.038 y las referencias analizadas en ese documento, cada una de las cuales se hace referencia en el presente documento. Pueden prepararse otros análogos de citidina proporcionados en el presente documento, por ejemplo, usando procedimientos conocidos en la técnica, o pueden adquirirse de una fuente comercial. El compuesto usado en los métodos proporcionados en el presente documento puede ser una base libre o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma. La base libre o la sal o el solvato farmacéuticamente aceptable es un sólido. La base libre o la sal o el solvato farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido en forma amorfa. La base libre o la sal o el solvato farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido en forma cristalina. Por ejemplo, se proporciona en el presente documento 5-azacitidina en formas sólidas, que pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos en las Patentes de EE.UU. N.º 6.943.249, 6.887.855 y 7.078.518 y en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2005/027675, 2006/247189 y el documento WO2010/093435, cada una de las cuales se hace referencia en el presente documento. La 5-azacitidina en formas sólidas puede prepararse usando otros métodos conocidos en la técnica.

El compuesto usado en los métodos proporcionados en el presente documento puede ser una sal farmacéuticamente aceptable del análogo de citidina, que incluye, pero no se limita a, sales de acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato (besilato), bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, alcanforsulfonato, propionato de ciclopentano, digluconato, dodecilsulfato, 1,2-etanodisulfonato (edisilato), etanosulfonato (esilato), formiato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactato, maleato, malonato, metanosulfonato (mesilato), 2-naftalenosulfonato (napsilato), nicotinato, nitrato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, tosilato o undecanoato.

Composiciones farmacéuticas: En el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o más análogos de citidina, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos,

como un principio activo, en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica puede comprender al menos un excipiente o vehículo que controla la no liberación. La composición farmacéutica puede comprender al menos un excipiente o vehículo que controla la liberación y al menos uno que controla la no liberación.

5

El análogo de citidina usado en las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento puede estar en forma sólida. Las formas sólidas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, formas sólidas que comprenden la base libre del análogo de citidina y formas sólidas que comprenden sales del análogo de citidina. Las formas sólidas proporcionadas en el presente documento pueden incluir polimorfos, solvatos (incluyendo hidratos) y cocristales que comprenden el análogo de citidina y/o sales de los mismos. La forma sólida puede ser una forma cristalina del análogo de citidina, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

Las preparaciones proporcionadas en el presente documento pueden formularse en diversas formas de dosificación para administración óptica, intravítrea, parenteral y tópica. Las composiciones farmacéuticas también pueden formularse como formas farmacéuticas de liberación modificada, incluyendo formas farmacéuticas de liberación retrasada, extendida, prolongada, sostenida, pulsada, controlada, acelerada y rápida, dirigida, programada y de retención gástrica. Estas formas de dosificación pueden prepararse de acuerdo con métodos y técnicas convencionales conocidos por los expertos en la materia {véanse, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edición; Lippincott Williams & Wilkins: Filadelfia, PA, 2005; Modified-Release Drug Delivery Technology, Rathbone et al, eds., Drugs and the Pharmaceutical Science, Marcel Dekker, Inc.: Nueva York, NY, 2003; Vol. 126). En una realización, los preparados se proporcionan en una forma farmacéutica para administración intravítrea. En otra realización, los preparados se proporcionan en una forma farmacéutica para administración parenteral. En otra realización más, las composiciones farmacéuticas se proporcionan en una forma farmacéutica para administración tópica.

15

20

25

En una realización, las preparaciones proporcionadas en el presente documento pueden administrarse tópicamente en el ojo o por vía intravítrea en forma de insertos, inyecciones, implantes, pastas, polvos, apósitos, cremas, escayolas, pomadas, soluciones, emulsiones, suspensiones, geles, espumas o pulverizadores. Estas formas farmacéuticas pueden fabricarse usando procesos convencionales como se describe en, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, anteriormente citado. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento para administración tópica pueden formularse para que sean de liberación inmediata o de liberación modificada, incluyendo liberación retrasada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

30

35

Actualmente se está desarrollando decitabina como un fármaco para el tratamiento de la leucemia mielógena crónica (CML, por sus siglas en inglés), síndrome mielodisplásico (MDS, por sus siglas en inglés), cáncer de pulmón no microcítico (NSCL), anemia falciforme y leucemia mielógena aguda (AML, por sus siglas en inglés).

40

La decitabina puede incluir una formulación que comprende: (a) un compuesto de la fórmula mostrada en la Figura imgf000003_0001 del documento WO2013033176, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; disuelta en (b) un disolvente sustancialmente anhidro que comprende de aproximadamente el 45 % a aproximadamente el 85 % de propilenglicol; de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 45 % de glicerina; y del 0 % a aproximadamente el 30 % de etanol. Dicho disolvente puede comprender de aproximadamente el 65 % a aproximadamente el 70 % de propilenglicol; de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 30 % de glicerina y del 0 % a aproximadamente el 10 % de etanol.

45

La divulgación proporciona una composición que comprende un agente de desmetilación y un excipiente o un portador farmacéuticamente aceptables. La expresión "excipiente o portador farmacéuticamente aceptables" se refiere a un medio que se usa para preparar una forma de dosificación deseada de un compuesto. Un excipiente o un portador farmacéuticamente aceptables pueden incluir uno o más disolventes, diluyentes u otros vehículos líquidos; coadyuvantes de dispersión o suspensión; agentes tensioactivos; agentes isotónicos; agentes espesantes o emulsionantes; conservantes; aglutinantes sólidos; lubricantes; y similares. Remington's Pharmaceutical Sciences, Decimoquinta Edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1975) y Handbook of Pharmaceutical Excipients, Tercera edición, A. H. Kibbe ed. (American Pharmaceutical Assoc. 2000), desvelan diversos portadores usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. En una realización, el excipiente farmacéuticamente aceptable no es perjudicial para un mamífero (por ejemplo, paciente humano) si se administra en el ojo (por ejemplo, mediante inyección intraocular). Para la administración intraocular, por ejemplo y sin limitación, el agente terapéutico puede administrarse en una solución salina equilibrada (BSS) o una solución salina equilibrada Plus (BSS Plus) (Alcon Laboratories, Fort Worth, Tex., EE.UU.). En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona un recipiente estéril, por ejemplo, un vial, que contiene un agente de desmetilación terapéuticamente aceptable, opcionalmente una preparación liofilizada.

50

55

60

Otra realización de la presente invención se refiere a la administración de preparaciones que comprenden construcciones de ácido nucleico que son capaces de efectuar la inhibición de la metilación mediante terapia génica.

65

El documento WO 2001/58494 se dirige al tratamiento o la prevención de una enfermedad ocular, tal como degeneración macular relacionada con la edad, poniendo en contacto una célula ocular con un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de la angiogénesis y un agente neurotrófico. En realizaciones específicas, el inhibidor de la angiogénesis y el agente neurotrófico son uno y son lo mismo, tal como el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF). El documento WO 2002/13812 se refiere al uso de un agente sensibilizante a la insulina, preferentemente agonistas del receptor y activado por proliferador de peroxisomas (PPAR γ), para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, tal como una enfermedad oftálmica. El documento WO 200/52479 aborda el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de los trastornos asociados a las drusas (cualquier trastorno que implique la formación de drusas), incluyendo AMD. En realizaciones específicas, existen métodos relacionados con proporcionar una cantidad eficaz de un agente que inhibe la proliferación o diferenciación de células inmunitarias, tales como antagonistas del TNF-alfa.

En el presente documento se desvelan métodos para tratar a un individuo con AMD (por ejemplo, un individuo en quien se detecta un polimorfismo o haplotipo indicativo de un riesgo elevado de desarrollar AMD sintomática) u otra enfermedad que implique una variante del gen de metilación *ELOVL2*. El método puede incluir administrar al paciente un agente que disminuye la cantidad de una metilación o expresión de *ELOVL2* variante de una metilación del gen que codifica *ELOVL2* en una cantidad eficaz para reducir un síntoma de la enfermedad en el paciente. Puede administrarse una cantidad terapéutica de un inhibidor (por ejemplo, inactivador) del polipéptido de metilación de *ELOVL2* variante en el individuo.

Un ácido nucleico inhibidor (por ejemplo, un ARN complementario a al menos una porción de la secuencia de nucleótidos del polipéptido de metilación de *ELOVL2* variante) en el individuo puede administrarse. Puede administrarse ARN antisentido purificado complementario al ARN que codifica un polipéptido de metilación de *ELOVL2* variante.

Una cantidad terapéutica de un anticuerpo de metilación anti-*ELOVL-2* puede ser suficiente para inactivar parcialmente la variante del polipéptido de metilación *ELOVL2* en el individuo que se administra.

En un aspecto, la invención proporciona vectores de terapia génica que comprenden ácido nucleico que codifica el polipéptido de metilación de *ELOVL2*. El vector puede incluir un promotor que dirige la expresión del gen de metilación de *ELOVL2* en múltiples tipos de células. Como alternativa, el vector puede incluir un promotor que impulsa la expresión del gen de metilación de *ELOVL2* solo en tipos de células específicas, por ejemplo, en las células de la retina. En un aspecto, se proporcionan preparaciones que contienen un vector de terapia génica que codifica una proteína de metilación de *ELOVL2* y un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde la preparación está libre de patógenos y es adecuada para su administración a un paciente humano. El polipéptido de metilación de *ELOVL2* codificado puede ser una variante protectora.

Se proporciona en el presente documento una composición que contiene el polipéptido de metilación de *ELOVL2* recombinante o purificado, donde el polipéptido es una variante protectora.

Se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica que contiene el polipéptido de metilación de *ELOVL2* recombinante o purificado y un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde la composición está libre de patógenos y es adecuada para su administración a un paciente humano. El polipéptido de metilación de *ELOVL2* codificado puede tener la secuencia de tipo silvestre. El polipéptido de metilación de *ELOVL2* codificado puede ser una variante protectora.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos que interactúan específicamente con un polipéptido de metilación de *ELOVL2* variante pero no con un polipéptido de metilación de *ELOVL2* de tipo silvestre. Estos anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales y pueden obtenerse mediante técnicas sustractivas. Estos anticuerpos pueden ser suficientes para inactivar un polipéptido de metilación de *ELOVL2* variante. En el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen un anticuerpo de metilación anti-*ELOVL2* y un excipiente farmacéuticamente aceptable, donde la composición está libre de patógenos y es adecuada para su administración a un paciente humano.

En el presente documento se proporcionan métodos para identificar proteínas de metilación de *ELOVL2* variantes asociadas a un mayor o menor riesgo de desarrollar AMD. En el presente documento se proporciona un método para identificar una proteína de metilación de *ELOVL2* protectora (a) identificando a un individuo que tiene un haplotipo protector y (b) determinando la secuencia o secuencias de aminoácidos de la metilación de *ELOVL2* codificadas en el genoma del individuo, donde una proteína de metilación de *ELOVL2* protectora está codificada por un alelo que tiene un haplotipo protector. En el presente documento se proporciona un método para identificar una proteína de metilación de *ELOVL2* neutra (a) identificando a un individuo que tiene un haplotipo neutro y (b) determinando la secuencia o secuencias de aminoácidos de la metilación de *ELOVL2* codificadas en el genoma del individuo, donde una proteína de metilación de *ELOVL2* neutra está codificada por un alelo que tiene un haplotipo neutro. En el presente documento se proporciona un método para identificar una forma variante de metilación de *ELOVL2* asociada a un riesgo reducido de desarrollar AMD que comprende (a) identificar a un

individuo por tener un haplotipo o diplotipo asociado con un riesgo reducido de desarrollar AMD; (b) obtener ADN o ARN genómico del individuo; y (c) determinar la secuencia o secuencias de aminoácidos de la metilación de ELOVL2 codificada en el genoma del individuo, donde una proteína protectora de metilación ELOVL2 está codificada por un alelo que tiene un haplotipo asociado a un menor riesgo de desarrollar AMD. Las proteínas de metilación de ELOVL2 protectoras o neutras pueden no tener la secuencia de aminoácidos del polipéptido de metilación de ELOVL2 de tipo silvestre.

Como comprenderán aquellos expertos en la materia, los vectores de terapia génica contienen los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia codificante insertada (y pueden incluir, por ejemplo, un promotor, un potenciador, otros elementos regulatorios). Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Pueden seleccionarse promotores para dirigirse a la expresión génica preferencial en un tejido diana, tal como el RPE (para revisiones recientes véase Sutanto *et al.*, 2005, "Development and evaluation of the specificity of a cathepsin D proximal promoter in the eye" *Curr Eye Res.* 30:53-61; Zhang *et al.*, 2004, "Concurrent enhancement of transcriptional activity and specificity of a retinal pigment epithelial cell-preferential promoter" *Mol Vis.* 10:208-14; Esumi *et al.*, 2004, "Analysis of the VMD2 promoter and implication of E-box binding factors in its regulation" *J Biol Chem* 279:19064-73; Camacho-Hubner *et al.*, 2000, "The Fugu rubripes tyrosinase gene promoter targets transgene expression to pigment cells in the mouse" *Genesis.* 28:99-105; y las referencias en los mismos).

Los vectores víricos adecuados incluyen vectores de virus de ADN (tales como vectores adenovíricos, vectores de virus adenoasociados, vectores de lentivirus y vectores de virus vaccinia) y vectores de virus de ARN (tales como vectores retrovíricos). En una realización, se usa un vector vírico adenoasociado (AAV). Para revisiones recientes véanse Auricchio *et al.*, 2005, "Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer and treatment of retinal diseases" *Curr Gene Ther.* 5:339-48; Martin *et al.*, 2004, "Gene therapy for optic nerve disease" *Eye* 18:1049-55; Ali, 2004, "Prospects for gene therapy" *Novartis Found Symp.* 255:165-72; Hennig *et al.*, 2004, "AAV-mediated intravitreal gene therapy reduces lysosomal storage in the retinal pigmented epithelium and improves retinal function in adult MPS VII mice" *Mol Ther.* 10:106-16; Smith *et al.*, 2003, "AAV-Mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa" *Mol Ther.* 8:188-95; Broderick *et al.*, 2005, "Local administration of an adeno-associated viral vector expressing IL-10 reduces monocyte infiltration and subsequent photoreceptor damage during experimental autoimmune uveitis" *Mol Ther.* 12:369-73; Cheng *et al.*, 2005, "Efficient gene transfer to retinal pigment epithelium cells with long-term expression" *Retina* 25:193-201; Rex *et al.*, "Adenovirus-mediated delivery of catalase to retinal pigment epithelial cells protects neighboring photoreceptors from photo-oxidative stress" *Hum Gene Ther.* 15:960-7; y las referencias citadas en los mismos).

Los vectores de terapia génica deben producirse de conformidad con los requisitos de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) para que el producto sea adecuado para su administración a los pacientes. La presente invención proporciona vectores de terapia génica adecuados para la administración a pacientes, incluyendo vectores de terapia génica que se producen y se prueban de acuerdo con los requisitos de GMP. Los vectores de terapia génica sujetos a la aprobación de la FDA deben someterse a pruebas para determinar su potencia e identidad, ser estériles, estar libres de materiales extraños y todos los ingredientes de un producto (es decir, conservantes, diluyentes, adyuvantes y similares) deben cumplir normativas de pureza, calidad y no ser perjudiciales para el paciente. Por ejemplo, se demuestra que la preparación de ácido nucleico está libre de micoplasmas. Véase, por ejemplo, Islam *et al.*, 1997, "An academic centre for gene therapy research and clinical grade manufacturing capability" *Ann Med* 29, 579-583.

Se conocen métodos para administrar vectores de terapia génica. En una realización, los vectores de expresión de ELOVL2 se introducen por vía sistémica (por ejemplo, por vía intravenosa o por infusión). En una realización, los vectores de expresión ELOVL2 se introducen localmente (es decir, directamente a un tejido u órgano en particular, por ejemplo, ojo). En una realización preferida, los vectores de expresión ELOVL2 se introducen directamente en el ojo (por ejemplo, por inyección ocular). Para revisiones recientes véanse, por ejemplo, Dinulescu *et al.*, 2005, "Adeno-associated virus-vector gene therapy for retinal disease" *Hum Gene Ther.* 16:649-63; Rex *et al.*, 2004, "Adenovirus-mediated delivery of catalase to retinal pigment epithelial cells protects neighboring photoreceptors from photo-oxidative stress" *Hum Gene Ther.* 15:960-7; Bennett, 2004, "Gene therapy for Leber congenital amaurosis" *Novartis Found Symp.* 255:195-202; Hauswirth *et al.*, "Range of retinal diseases potentially treatable by AAV-vector gene therapy" *Novartis Found Symp.* 255:179-188 y las referencias citadas en los mismos).

Por lo tanto en un aspecto, la invención proporciona una preparación que comprende un vector de terapia génica que codifica una proteína ELOVL2 o un polipéptido ELOVL2, un vector vírico, donde el vector de terapia génica es adecuado para la administración a un sujeto humano y en un excipiente adecuado para la administración a un sujeto humano (por ejemplo, producido usando técnicas GLP). Opcionalmente el vector de terapia génica comprende un promotor que se expresa preferencial o específicamente en células del epitelio pigmentado de la retina.

Los métodos para la prevención y el tratamiento de trastornos orbitales asociados al envejecimiento ocular en mamíferos pueden incluir la aplicación de una composición tópica que comprende una cantidad que mejora la permeación de uno o más potenciadores de la penetración y uno o más agentes bioafectantes que penetran en

los tejidos subyacentes y en la red vascular de la órbita. Un objeto de este método es prevenir y tratar enfermedades oculares como la degeneración macular, pero también la formación de cataratas, glaucoma y retinopatía diabética.

5 La administración de medicamento al ojo puede facilitarse mediante un potenciador de la penetración o un potenciador de la permeación para aumentar la permeabilidad de la piel a un agente farmacológicamente activo para aumentar la velocidad a la que el fármaco se difunde a través de la piel y entra en los tejidos y el torrente sanguíneo. Un potenciador químico de la penetración en la piel aumenta la permeabilidad de la piel al alterar reversiblemente la naturaleza fisicoquímica del estrato córneo para reducir su resistencia a la difusión.

10

Se sabe que muchos compuestos químicos mejoran la penetración en la piel. La mayoría de los compuestos generalmente se reconocen como ingredientes seguros (GRAS) que un formulador a menudo consideraría inertes. Osborne D W, Henke J J, Pharmaceutical Technology, nov. de 1997, pp 58-86. Los compuestos citados en el artículo se mencionan en el presente documento. Los ejemplos de potenciadores de la penetración incluyen: 15 alcoholes, tales como etanol e isopropanol; polioles, tales como n-alcanoles, limoneno, terpenos, dioxolano, propilenglicol, etilenglicol, otros glicoles y glicerol; sulfóxidos, tales como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida, metildodecilsulfóxido, dimetilacetamida; ésteres, tales como miristato/palmitato de isopropilo, acetato de etilo, acetato de butilo, propionato de metilo y triglicéridos cáprico/caprílico; cetonas; amidas, tales como acetamidas; oleatos, tales como trioleína; diversos tensioactivos, tales como el lauril sulfato sódico; diversos ácidos 20 alcanólicos, tales como ácido caprílico; compuestos lactámicos, tales como azona; alcanoles, tales como alcohol oleílico; acetatos de dialquilamino y mezclas de los mismos.

20

Varias patentes desvelan el uso de potenciadores de la penetración para suministrar medicamentos por vía transdérmica. La Pat. de EE.UU. N.º 5.837.289, desvela el uso de al menos dos potenciadores de la penetración 25 separados en una crema para suministrar una lista extensa de medicamentos. La Pat. de EE.UU. N.º 5.238.933, desvela una composición potenciadora de la permeación de la piel que comprende un éster alifático inferior de un ácido carboxílico alifático inferior en combinación con un alcohol inferior para administrar un principio activo. La Pat. de EE.UU. N.º 5.229.130, desvela un potenciador de la permeación de la piel a base de aceite vegetal para administrar principios activos a través de la piel. La Pat. de EE.UU. N.º 4.933.184, desvela una composición 30 transdérmica que usa metanol de forma secuencial o simultánea para suministrar fármacos. La Pat. de EE.UU. N.º 4.342.784, desvela un método para administrar tópicamente un gel con DMSO y resina de carboxipolimetileno con un agente neutralizante para permitir que la sal para la piel descomponga el gel para liberar el DMSO. La Pat. de EE.UU. N.º 5.482.965, desvela una composición transdérmica que contiene un dioxano. Las Pat. de EE.UU. N.º 5.620.980, 5.807.957, desvelan el uso de un dioxolano y uretano para tratar la caída del cabello.

35

En un aspecto, la penetración transconjuntival de Agentes de desmetilación y agentes o compuestos terapéuticos, farmacéuticos, bioquímicos y biológicos puede facilitarse mediante potenciadores que pueden usarse para acelerar aún más la entrada de estos agentes en la cámara anterior, la malla trabecular, el cuerpo ciliar, la coroides y la retina. Los potenciadores de la penetración no solo penetran una membrana de manera eficiente, sino que estos 40 potenciadores también permiten que otros agentes bioactivos atraviesen una membrana particular de manera más eficiente. Los potenciadores de la penetración producen su efecto mediante diversas modalidades tal como la interrupción de las capas celulares de la superficie del saco conjuntival al interactuar con proteínas y lípidos intracelulares, o la mejora de la distribución de agentes bioactivos cuando entran en contacto con las membranas mucosas.

45

Con estos potenciadores, las macromoléculas de hasta 10 kDa pueden atravesar las capas del saco conjuntival de los ojos y llegar al sitio del glaucoma donde los vasos sanguíneos y la retina están experimentando cambios patológicos. Estos potenciadores deben ser sustancias no tóxicas, farmacológicamente inertes, no alérgicas. En general estos potenciadores pueden incluir tensioactivos aniónicos, ureas, ácidos grasos, alcoholes grasos, 50 terpenos, tensioactivos catiónicos, tensioactivos no iónicos, tensioactivos zwitteriónicos, polioles, amidas, lactama, acetona, alcoholes y azúcares. En un aspecto, el potenciador de la penetración 10 incluye dialquilsulfóxidos tales como dimetilsulfóxido (DMSO), decilmetsulfóxido, óxido de dodecil dimetil fosfina, octilmetsulfóxido, nonil metil sulfóxido, undecilmetsulfóxido, dodecilsulfato sódico y fenilpiperazina o cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto, el potenciador de la penetración puede incluir alcohol laurílico, sebacato de diisopropilo, alcohol oleílico, sebacato de dietilo, sebacato de dioctilo, azelato de dioctilo, laurato de hexilo, caprato de etilo, estearato de butilo, sebacato de dibutilo, adipato de dioctilo, dipelargonato de propilenglicol, laurato de etilo, laurato de butilo, miristato de etilo, miristato de butilo, palmitato de isopropilo, isoestearato de isopropilo, pelargonato de 2-etilhexilo, benzoato de butilo, benzoato de bencilo, salicilato de bencilo, ftalato de dibutilo o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, el potenciador de la permeabilidad cutánea es al menos mayor que el 1 % en peso por 60 volumen, peso por peso o porcentaje molar.

60

En otro aspecto, el potenciador de la permeabilidad de la membrana mucosa puede ser al menos mayor que el 1,5 %, el 2,0 %, el 2,5 %, el 3,0 %, el 3,5 %, el 4,0 %, el 4,5 % hasta el 50 % peso por volumen, peso por peso o porcentaje molar. En un aspecto, el potenciador de la permeabilidad de la membrana mucosa es dimetilsulfóxido. 65 En este aspecto, la cantidad de dimetilsulfóxido puede variar del 2 % al 10 %, del 2 % al 9,5 %, del 3 % al 8 %, del 3 % al 7 % o del 4 % al 6 % en peso por volumen, peso por peso, en porcentaje molar o cualquier cantidad

65

terapéutica eficaz.

La preparación terapéutica también puede contener agentes emulsionantes, conservantes, humectantes no tóxicos, agentes que dan cuerpo, como por ejemplo, polietilenglicoles 200, 300, 400 y 600, carboceras 1.000, 1.500, 4.000, 6.000 y 10.000, componentes antibacterianos tales como compuestos de amonio cuaternario, sales fenilmercúricas que se sabe que tienen propiedades esterilizantes en frío y que no son nocivas en su uso, metil y propil parabeno, alcohol bencílico, feniletanol, ingredientes tampón tales como borato sódico, acetatos sódicos, tampones gluconato y otros ingredientes convencionales tales como monolaurato de sorbitán, trietanolamina, oleato, monopalmitato de polioxietilensorbitán, dioctilsulfosuccinato sódico, monotioglicerol, tiosorbitol, etilendiamino tetracético. Adicionalmente, pueden usarse vehículos oftálmicos apropiados como medios portadores para el fin actual incluyendo sistemas de vehículos de tampón fosfato convencionales, vehículos isotónicos de ácido bórico, vehículos isotónicos de cloruro sódico, vehículos isotónicos de borato sódico y similares.

La preparación de agentes terapéuticos del Agente de Desmetilación también puede contener tensioactivos tales como tensioactivos de polisorbato, tensioactivos de polioxietileno (BASF Cremaphor), fosfonatos, saponinas y aceites de ricino polietoxilados y aceites de ricino polietoxilados que se encuentran disponibles en el mercado.

La preparación farmacéutica también puede contener agentes humectantes que ya se usan en soluciones oftálmicas tales como arboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, glicerina, manitol, alcohol polivinílico o hidroxietilcelulosa y el agente diluyente puede ser agua, agua destilada, agua esterilizada o lágrimas artificiales. El agente humectante está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 10 %.

La formulación oftálmica puede incluir ácidos y bases para ajustar el pH; agentes que imparten tonicidad tales como sorbitol, glicerina y dextrosa; otros agentes que imparten viscosidad tales como carboximetilcelulosa sódica, polivinilpiridona, alcohol polivinílico y otras gomas; potenciadores de absorción adecuados, tales como tensioactivos, ácidos biliares; agentes estabilizantes tales como antioxidantes, como bisulfitos y ascorbatos; agentes quelantes de metales, tales como EDTA sódico, y potenciadores de la solubilidad de los fármacos, tales como polietilenglicoles. Estos ingredientes adicionales ayudan a crear soluciones comerciales con estabilidad para que no sea necesario combinarlos según sea necesario.

Las composiciones de medicamentos oftálmicos se formularán de tal manera que sean compatibles con los ojos y/o las lentes de contacto. El preparado de colirio debe ser isotónico con la sangre. Al igual que las composiciones oftálmicas destinadas a la aplicación directa al ojo, se formularán de manera que tengan un pH y una tonicidad que sean compatibles con el ojo. Esto normalmente requerirá un tampón para mantener el pH de la composición en o cerca del pH fisiológico (es decir, 7,4) y puede requerir un agente de tonicidad para llevar la osmolalidad de la composición a un nivel cercano a 210-320 milimoles por kilogramo (mOsm/kg).

Ejemplos

Las líneas celulares WI-38 e IMR-90 se han descrito anteriormente como modelos ampliamente usados para estudiar el envejecimiento celular. Se ha demostrado que ambas líneas celulares muestran cambios significativos en el fenotipo a lo largo del tiempo y en el número de duplicación de la población (PD) [19, 20]. Su tasa de crecimiento, medida como confluencia mediante software de formación de imágenes, disminuye notablemente de una PD más baja a una PD más alta (Fig. 6A y 7A). El porcentaje de células positivas para la senescencia, medido por la tinción con beta-galactosidasa asociada a la senescencia (SA-β-Gal) aumenta a medida que aumenta la PD (Fig. 6B y Fig. 7B) y su morfología cambia de una forma más alargada a una forma más amplia más plana (Fig. 6C).

Los estudios sobre los perfiles de metilación del envejecimiento humano indicaron que la metilación de la región promotora de *ELOVL2* es, con diferencia, el que se correlaciona más significativamente con la edad [3]. Para investigar los cambios en el nivel de metilación del promotor de *ELOVL2* en células WI38 e IMR90 envejecidas, se usó inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDIP). Se diseñaron cebadores que abarcan los CpG específicos descritos en la Tabla 1. Usando este enfoque, se descubrió que la metilación del promotor aumenta al duplicarse la población celular (Fig. 1A). Como se ha demostrado previamente que la metilación de la región promotora inhibe la transcripción [21], se investigó si el nivel de expresión de *ELOVL2* se correlaciona inversamente con el promotor de *ELOVL2*. Usando qRT-PCR, se descubrió que el nivel de expresión del gen disminuye al aumentar el número de PD (Fig. 1B y Fig. 7C), llevando a la conclusión de que la expresión de *ELOVL2* está regulada negativamente en las células envejecidas, con aumentos acompañados en la metilación del promotor de *ELOVL2* y el porcentaje de células senescentes en cultivo.

Se investigó si la modular la expresión de *ELOVL2* podría influir en el envejecimiento celular. En primer lugar, usando ARNhp lentivírico, la expresión de *ELOVL2* en células WI-38 e IMR-90 se atenuó (Fig. 6E y Fig. 8D) y se observó una disminución significativa en la tasa de proliferación (Fig. 1C), así como un mayor número de células senescentes en cultivo detectadas mediante tinción con SA-β-Gal (Fig. 1D), y cambios morfológicos consistentes con células con alta PD (Fig. 6D). Todas las observaciones en conjunto indicaron un aumento en la edad aparente de los fibroblastos.

Se probó el efecto del nivel de metilación del promotor de *ELOVL2* sobre la expresión de *ELOVL2*. Los fibroblastos WI-38 se trataron con 5-Aza-2'-desoxicitidina (5-Aza-dc), un análogo de citidina que inhibe la ADN metiltransferasa [22]. Las células se trataron durante 2 días con 5-Aza-dc 2 μ M seguido de 5 días de cultivo sin el compuesto. Al final del experimento, la expresión de *ELOVL2* se midió mediante qRT-PCR. Se descubrió que tras el tratamiento con 5-Aza-dc, la metilación del promotor de *ELOVL2* se reduce (Fig. 2A), mientras que la expresión de *ELOVL2* está regulada positivamente (Fig. 2B). Por otro lado, tras el tratamiento con 5-Aza-dc, se observó en cultivo un porcentaje menor de células senescentes (Fig. 2C). Estos datos sugieren que la disminución de la metilación del promotor de *ELOVL2* influye positivamente en la expresión de *ELOVL2* y la edad aparente de los fibroblastos.

La visión se encuentra entre los principales predictores del envejecimiento. La puntuación de sensibilidad al contraste visual estuvo entre los 5 principales predictores individuales de la edad en relación con 377 variables evaluadas [23]. Las proteínas ELOVL se expresan altamente en los ojos y varias de ellas se han implicado en enfermedades oculares [9, 24]. Sin embargo, solo en el modelo de metilación *ELOVL2* contiene marcas de metilación que están altamente correlacionadas con la edad [3]. Por lo tanto, se investigó si el nivel de expresión de *ELOVL2* en las retinas de ratones de tipo silvestre (C57BL/6) cambia con la edad. Se descubrió mediante qRT-PCR y transferencia Western que, similar a los datos del envejecimiento de los fibroblastos humanos, el nivel de expresión de *ELOVL2* se correlaciona inversamente con la edad del animal (Fig. 3A y 3B). Lo más importante, el análisis MeDIP indicó que la metilación del promotor de *ELOVL2* en la retina aumenta con la edad del animal (Fig. 3C).

En paralelo, se investigó la metilación del promotor de *ELOVL2* y los niveles de expresión de ARNm en las retinas disecadas de ratones *Ames dwarf* (*Prop1^{df}*), que viven significativamente más tiempo y exhiben muchos síntomas de envejecimiento retrasado en comparación con los ratones de tipo silvestre [25, 26]. Se descubrió que las retinas de *Ames dwarf* envejecidos muestran menor metilación del promotor de *ELOVL2* y expresión aumentada en comparación con ratones envejecidos de tipo silvestre (Fig. 9). Esto sugiere que la expresión y la metilación de *ELOVL2* podrían ser indicativas de la salud animal.

Se evaluó si el rendimiento visual y la estructura ocular cambian durante el período de edad estudiado del animal. En primer lugar, se evaluaron los cambios estructurales usando imágenes de autofluorescencia del fondo de ojo de ratones C57BL/6 de tipo silvestre a la edad de 2 meses, 6 meses, 1 año y 2 años. Se observó que los agregados puntiformes autofluorescentes comienzan a aparecer en el fondo de ojo a 1 año de edad, y son muy pronunciados a los 2 años (Fig. 3D y Fig. 8A). A continuación para evaluar la función visual de los ratones envejecidos, se realizó un análisis de electroretinograma (ERG). A medida que los ratones envejecen, el número y la sensibilidad de los bastones disminuye [27]. De hecho, los ratones más viejos mostraron una amplitud de respuesta escotópica disminuida por ERG (Fig. 3D y 3E).

Para investigar si *ELOVL2* juega un papel en el envejecimiento ocular y el rendimiento visual, se generaron ratones C57BL/6 mutantes *ELOVL2* usando CRISPR-Cas9 emparejado con recombinación homóloga. Dado que los ratones inactivados *ELOVL2* muestran reducciones en la fertilidad [28], en su lugar se generaron ratones mutantes *ELOVL2* que codifican una sustitución de cisteína por triptófano (C217W) que se ha demostrado que cambia la especificidad del sustrato de *ELOVL2* a la de *ELOVL5*, alterando eficazmente la capacidad única de *ELOVL2* para convertir el C22 omega-3 PUFA ácido docosapentaenoico (DPA) (22:5n-3) en 24:5n-3 [6]. Se diseñaron dos ARNg para dirigirse a *ELOVL2* cerca del codón 217 y un oligonucleótido donante de reparación con una mutación de par de bases para generar el mutante C217W, junto con mutaciones silenciosas para interrumpir la guía y la secuencia del motivo adyacente al protoespaciador para evitar una nueva escisión después de la edición. El ARNg, el oligonucleótido de reparación y ARNm de Cas9 se inyectaron en cigotos de ratón C57BL/6N (Fig. 4A y Fig. 10A-10D). Se identificó un fundador homocigoto correctamente dirigido a partir de uno de los ARNg. No se encontraron mutaciones inespecíficas (Fig. 10E). Los ratones homocigotos C217W se desarrollaron normalmente, sin mostrar ningún fenotipo manifiesto.

Después se investigó si la estructura del ojo y el rendimiento visual cambiaban en el mutante C217W. De manera interesante, en los ratones mutantes *ELOVL2*, los agregados autofluorescentes aparecen en el fondo de ojo con tan solo 6 meses de edad, mucho antes que en ratones de tipo silvestre (Fig. 4B y Fig. 3D), mostrando que es la actividad de *ELOVL2* normal es crucial para mantener una retina sana. Este fenotipo se observó consistentemente en animales mutantes de 4, 6, 8 y 12 meses de edad (Fig. 11A).

Después se probó la función de los fotorreceptores de estos ratones mutantes usando ERG. En comparación con los compañeros de camada de tipo silvestre, se observó una disminución en la amplitud de la respuesta escotópica en ratones mutantes C217W (Fig. 4B y 4C). Esta respuesta reducida se reprodujo consistentemente en otras edades (Fig. 11B). Aunque la señal más afectada fue la respuesta escotópica, otros tipos de mediciones de ERG también se vieron afectados en mutantes *ELOVL2*, incluyendo potencial oscilatorio y respuesta de parpadeo (Fig. 11C y 11D).

Las retinas de ratones C217W y TS se inmunotifieron para investigar si los agregados observados como puntos en las imágenes del fondo de ojo de autofluorescencia eran similares a las drusas, que en humanos son un factor

de riesgo para desarrollar AMD [14]. De hecho, la inmunotinción detectó agregados positivos para HTRA1, T-15, C3 y C5b-9 solo en las retinas C217W (Fig. 4D, 4E y Fig. 12). Dada la prominencia y el desarrollo temprano de agregados similares a drusas en los ratones mutantes, potencialmente pueden ser modelos de AMD.

5 Finalmente, se investigó si las características del envejecimiento en los ojos de los ratones podrían revertirse mediante la desmetilación del ADN, incluyendo el promotor *ELOVL2*. Para hacer eso, a cada ratón se le inyectó 1 µl de 5-Aza-dc 2 µM en un ojo y 1 µl de PBS en el otro ojo, cada dos semanas durante un período de 2 meses a partir de los 10 meses de edad. Se descubrió, usando el método MeDIP, que la metilación del promotor *ELOVL2* disminuyó después del tratamiento (Fig. 5A). También se descubrió que la expresión de *ELOVL2* se reguló positivamente en los ojos tratados (Fig. 5B). Finalmente, se comprobó la función de los fotorreceptores mediante ERG y se descubrió que la respuesta escotópica mejoró en los ojos inyectados (Fig. 5C y Fig. 13). Estos datos apoyan aún más que el estado de metilación de *ELOVL2* como una diana del envejecimiento y el uso de inhibidores de la ADN metiltransferasa influyen en las características del ojo envejecido.

15 Ejemplo de uso clínico humano: Administración quincenal (20 uM) durante tres meses en un paciente con AMD seca

Una mujer de 75 años con degeneración macular seca relacionada con la edad (AMD) bilateral se observa en una clínica de oftalmología. Por lo demás está sana. Ella consiente un estudio experimental que compara la terapia de desmetilación con el control. Al inicio del estudio, ambos ojos muestran un nivel similar de AMD, como lo demuestran las evaluaciones clínicas de agudeza visual, tamaño de la atrofia geográfica medida por autofluorescencia, tomografía de coherencia óptica y respuesta escotópica en electroretinografía. La paciente se trata con 100 ul de decitabina (20 uM) formulada como una solución estéril, isotónica, con pH tamponado administrada mediante inyección intravítrea en su ojo izquierdo (tratamiento activo). Ella recibe 100 ul de la misma solución estéril, isotónica, con pH tamponado pero sin decitabina administrada mediante inyección intravítrea en el ojo derecho (tratamiento control). Inmediatamente después de la administración de los tratamientos activo y control, se extrae una muestra de líquido intravítreo de cada ojo para realizar mediciones iniciales del nivel de expresión y la metilación de *ELOVL2*. Se observa que *ELOVL2* está hipermetilado en un grado similar en ambos ojos. Los niveles de expresión de *ELOVL2* también son similares y se observa un bajo nivel de expresión en ambos ojos. Tanto el tratamiento activo como el de control continúan en el ojo izquierdo y derecho respectivamente con administraciones cada dos semanas durante 3 meses. Tanto el tratamiento activo como el de control son igualmente bien tolerados durante el período de administración. Inmediatamente después de la última administración, se obtienen muestras de líquido intravítreo de ambos ojos para medir la expresión génica y la metilación de *ELOVL2*. Las mismas evaluaciones clínicas de atrofia geográfica realizadas al inicio del estudio se repiten para cada ojo. Se observan diferencias significativas entre el ojo tratado con decitabina en comparación con el control. En el ojo tratado con decitabina, la metilación de *ELOVL2* se reduce en casi un 30 % y la expresión génica de *ELOVL2* también aumenta en aproximadamente un 30 % en comparación con el valor inicial. También, la respuesta escotópica aumenta aproximadamente un 30 % con respecto al valor inicial. Además, no hay progresión del crecimiento de la atrofia geográfica medida por autofluorescencia del fondo de ojo en comparación con el valor inicial. En marcado contraste, no hay ningún cambio observable en el ojo control en ninguno de los otros parámetros. Los valores de metilación y expresión genética y de respuesta escotópica siguen siendo similares a los observados en los valores iniciales. La paciente regresa a la clínica para una visita de seguimiento a los 6 meses. La evaluación clínica revela que la mejora en la respuesta escotópica en el ojo tratado con decitabina es sostenida y muestra aproximadamente una mejora del 20 % al 30 % con respecto al valor inicial. La respuesta escotópica en el ojo de control sigue siendo similar al valor inicial.

Ejemplo de uso clínico humano: Administración (15 uM) una vez al mes durante 12 meses en un paciente con Atrofia Geográfica

50 Un varón de 65 años con degeneración macular senil (AMD) seca con atrofia geográfica es atendido en una clínica de oftalmología. Su visión, según la evaluación de la respuesta escotópica, está disminuyendo. Su área de atrofia geográfica, medida por autofluorescencia del fondo de ojo durante los últimos 2 años, muestra una progresión constante. Por lo demás está sano. El paciente se trata con 100 ul de decitabina (15 uM) formulada como una solución estéril, isotónica, con pH tamponado administrada mediante inyección intravítrea. Una muestra intravítrea extraída inmediatamente después de la administración de decitabina revela hipermetilación del promotor de *ELOVL2* y un bajo nivel de expresión de *ELOVL2*. El tratamiento con decitabina se continúa con la misma dosis administrada cada 5 semanas durante un período de 12 meses. Las administraciones son bien toleradas sin que se observen efectos adversos. Después de la última administración de decitabina, se obtiene una muestra de líquido vítreo y se analiza para detectar la metilación del gen *ELOVL2* y la expresión del gen *ELOVL2*. Los estudios revelan que la metilación de *ELOVL2* ha disminuido en casi un 60 % (desde el valor inicial) y la expresión del gen *ELOVL2* aumenta en aproximadamente un 50 % (por encima del valor inicial). La respuesta escotópica del paciente mejora notablemente y aumenta aproximadamente un 30 % con respecto al valor inicial. No hay crecimiento de atrofia geográfica medida por autofluorescencia del fondo de ojo.

65 Ejemplo de uso clínico humano: terapia del gen *ELOVL2*

Un varón de 70 años con degeneración macular senil (AMD) seca con atrofia geográfica es atendido en una clínica de oftalmología. Su visión, evaluada por la respuesta escotópica, ha ido disminuyendo constantemente. Su área de atrofia geográfica medida por autofluorescencia del fondo de ojo muestra una progresión constante. Por lo demás, está sano y consiente el tratamiento usando terapia del gen *ELOVL2*. Una semana antes del procedimiento de terapia génica se le inicia prednisona oral (0,5 mg/kg). Se crea un vector vírico adenoasociado recombinante con la secuencia codificante de *ELOVL2* y se empaqueta según las pautas de buenas prácticas médicas. Se suspende en una solución salina tamponada a un título de $1,5 \times 10^{11}$ genomas en alícuotas de 0,3 ml. Después de una semana de prednisona oral, se realiza una vitrectomía convencional para extirpar el vítreo cortical usando técnicas vitreoretiniales convencionales bajo anestesia general. Después se administra al paciente 0,3 ml de una solución salina tamponada que contiene un título de $1,5 \times 10^{11}$ genomas en total inyectados en el espacio subretiniano usando una cánula subretiniana especializada justo fuera de la mácula. Se realiza un intercambio aire-fluido y se suturan las heridas de manera convencional. El paciente continúa con prednisona oral (0,5 mg/kg), con una disminución gradual hasta finalizar 4 semanas después de la cirugía. El análisis de las células obtenidas de la muestra vítrea revela un bajo nivel de expresión de *ELOVL2*. El seguimiento a los 6 meses y al año después del procedimiento de terapia génica muestra que no hay progresión significativa en el área de atrofia geográfica medida por autofluorescencia del fondo de ojo y la visión evaluada por la respuesta escotópica mejora entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 30 %.

ANÁLISIS

Estudios anteriores han revelado una correlación muy significativa entre la metilación del promotor de *ELOVL2* y la edad en humanos [3, 29, 30]. En el estudio actual, se investigó si la metilación y la expresión de *ELOVL2* desempeñan un papel en los fenotipos de envejecimiento de los modelos de fibroblastos humanos y de retina de ratón.

Hayflick y Moorhead aislaron los fibroblastos WI-38 en la década de 1960 y se observó que experimentaban gradualmente signos de senescencia a medida que se dividían, primero desacelerando y luego deteniendo su división en 50 ± 10 duplicaciones de población, fenómeno que más tarde se conocería como límite de Hayflick [31]. Además, se descubrió que las células envejecían *in vivo* con el aumento de la edad [32], y se encontró que las células primarias de diferentes especies tenían una esperanza de vida *in vitro* máxima correlacionada con la esperanza de vida máxima de la especie [33]. Se descubrió que además de estos cambios, la expresión de *ELOVL2* disminuye al aumentar el número de pases en los fibroblastos humanos. Debido a que la metilación del promotor generalmente está inversamente correlacionada con la expresión, se esperaba que la metilación del promotor aumentara con el envejecimiento celular y se descubrió que esto era cierto. Debido a la disminución de la expresión en las células y al aumento de la metilación del promotor tanto en células como en seres humanos con la edad, se hipotetizó que la atenuación génica de *ELOVL2* daría lugar a fenotipos de envejecimiento avanzado. De hecho, las células tratadas con ARNhp dirigido contra *ELOVL2* mostraron expresión disminuida de *ELOVL2*, capacidad proliferativa disminuida, senescencia aumentada y un cambio en la morfología relacionado con la edad en comparación con las células de control.

Para investigar adicionalmente los fenotipos del envejecimiento, se crearon ratones mutantes *ELOVL2*. Usando CRISPR-Cas9, se generó una mutación C217W, que se demostró anteriormente que cambia la especificidad de sustrato del sitio catalítico *ELOVL2* al equivalente de *ELOVL5*, alterando eficazmente la capacidad única de *ELOVL2* para convertir el C22 omega-3 PUFA ácido docosapentaenoico (DPA) (22:5n-3) en 24:5n-3⁶. Se ha descubierto que tanto *ELOVL2* como *ELOVL5* alargan el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) al ácido docosapentaenoico (DPA; 22:5n-3), pero se sabe que solo *ELOVL2* alarga adicionalmente el DPA a 24:5n-3, el penúltimo precursor del DHA [6]. Por lo tanto se investigó la salud de los ojos de ratones mutantes *ELOVL2*.

Se observó la presencia de agregados proteicos en la retina a los 6 meses de edad, en comparación con 1 año en ratones de tipo silvestre mediante formación de imágenes de autofluorescencia. Las secciones de retina se tiñeron para detectar fosfolina oxidada (con anticuerpo T-15), HTRA1, C3 y C5b-9, todas las proteínas encontradas en las drusas, que se encuentran comúnmente en pacientes con degeneración macular relacionada con la edad (AMD).

La función de los fotorreceptores se evaluó mediante ERG. El ERG mide las señales eléctricas producidas por la retina en respuesta a un estímulo luminoso y, por lo tanto, puede detectar anomalías funcionales de los fotorreceptores. Debido a que la retina del ratón contiene principalmente fotorreceptores de bastones, las diferencias funcionales en sus señales eléctricas (respuesta escotópica) son más relevantes a la hora de evaluar el rendimiento visual. Además de la respuesta escotópica, también se investigó la respuesta del cono y el parpadeo de 10 Hz. Todas estas señales, pero más notablemente la respuesta escotópica, disminuyeron en amplitud tanto con la edad en ratones de tipo silvestre como en ratones mutantes en comparación con compañeros de camada de la misma edad. Junto con la presencia de agregados tipo drusas, estos indicadores de disminución de la función de los fotorreceptores son signos de AMD. Por lo tanto, se concluyó que la función de *ELOVL2* es crucial para prevenir la aparición temprana de agregados similares a drusas y mantener una función fotorreceptora saludable en ratones. Combinado con la aparición acelerada de agregados parecidos a drusas, la pérdida de la función fotorreceptora en ratones mutantes *ELOVL2* muestra que *ELOVL2* es una parte importante del mantenimiento de

una retina sana durante la vejez en ratones. Además, se descubrió que *ELOVL2* juega un papel importante a la hora de influir en los fenotipos del envejecimiento en las células humanas y podría influir potencialmente en el proceso de envejecimiento en un nivel más amplio.

- 5 Se descubrió que los ratones *ELOVL2* C217W presentaron agregados similares a drusas y una disminución de la sensibilidad de los fotorreceptores en una etapa significativamente más temprana que cualquiera de los compañeros de camada de control. Se concluyó que la mutación *ELOVL2* C217W es responsable del fenotipo de envejecimiento ocular acelerado. Tomado en conjunto, el presente estudio muestra evidencia de que *ELOVL2* juega un papel en las características del envejecimiento y, en particular, la función ocular. Además, el nivel de metilación en la región promotora de *ELOVL2* se correlaciona con su expresión y puede modificarse para influir potencialmente en las características del envejecimiento.

MÉTODOS

- 15 Cultivo y tratamiento celular.

Se cultivaron fibroblastos humanos WI-38 e IMR-90 en EMEM (ATCC) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Omega) y penicilina/estreptomicina al 1 % de (Gibco), y se mantuvieron en una incubadora humidificada al 5 % de CO₂ y 37 °C. La confluencia se calculó mediante software de formación de imágenes, incluyendo 3 campos de visión por muestra (10x). Tras confluir, las células se dividieron y se sembraron en una proporción de 1:3. Las duplicaciones de población (PD) se calcularon mediante el recuento de células. El lentivirus de atenuación génica se generó usando MISSION shRNA (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La 5-Aza-2'-desoxicitidina se adquirió de TSZ Chem (N.º CAS 2353-33-5) y se disolvió en medio de cultivo celular a una concentración de 2 µM. Las células se trataron durante un período de 48 horas. El medio se reemplazó a continuación con medio de cultivo celular normal y las células se cultivaron durante 5 días más.

Actividad de β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-gal).

30 La actividad de SA-β-gal en células cultivadas se determinó usando el kit de tinción Senescent β-Galactosidase (Cell Signaling Technology), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En lo sucesivo las células se tiñeron con DAPI y los porcentajes de células que se tiñeron positivamente se calcularon con un software de formación de imágenes (Keyence), incluyendo 3 campos de visión (10x).

35 Análisis de ácidos nucleicos.

Se aislaron ADN y ARN de fibroblastos humanos y tejidos de ratón con TRIzol (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN se convirtió en ADNc con el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad). La qPCR se realizó usando SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad).

40 La inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDIP) se realizó cortando 1 µg de ADN con Bioruptor (Diagenode) durante 8 ciclos en la configuración alta, consistiendo cada ciclo en 30 segundos de encendido y 30 segundos de apagado. El ADN cortado se desnaturalizó, se incubó con 1 µg de anticuerpo 5 mC MABE146 (Millipore) durante 2 horas, a continuación con perlas de proteína G SureBeads (Bio-Rad) durante 1 hora. Después del lavado, el ADN se purificó con el kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen). A continuación se realizó qPCR como anteriormente.

Transferencia Western.

50 Se sometieron a SDS-PAGE 10 µg de proteína total aislada con TRIzol (Ambion) de retinas de ratones TS de etapas variables del desarrollo. La transferencia Western se realizó mediante un protocolo bien aceptado (véase la Tabla 2 para conocer los anticuerpos usados en el estudio). El nivel de expresión de proteína *ELOVL2* se normalizó a H3.

55 Diseño CRISPR-Cas9.

Los reactivos CRISPR-Cas9 se generaron esencialmente como se describió anteriormente [34]. Se añadió el promotor T7 a la secuencia codificante de Cas9 clonada mediante amplificación por PCR. El producto T7-Cas9 se purificó a continuación en gel y se usó como plantilla para transcripción *in vitro* (IVT) usando el kit mMACHINE mMACHINE T7 ULTRA (Life Technologies). El promotor T7 y la secuencia de ARNsg se sintetizaron como un oligonucleótido largo (Ultramer, IDT) y se amplificaron por PCR. El producto de PCR T7-ARNsg se purificó en gel y se usó como plantilla para IVT usando el kit MEGAShortsript T7 (Life Technologies). Se sintetizó una plantilla de reparación que codifica la variante C217W como un oligonucleótido monocatenario (Ultramer, IDT) y se usó sin purificación. Los posibles inespecíficos se identificaron usando Cas-OFFinder35, seleccionando las dianas con menos coincidencias (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>). El ratón fundador y todos los ratones F1 fueron secuenciados para detectar dianas inespecíficas.

Inyección y análisis de animales.

Todos los procedimientos con animales se realizaron con la aprobación del Institutional Animal Care Committee de la Universidad de California, San Diego. A los cigotos de ratón C57BL/6N se les inyectaron construcciones CRISPR-Cas9. Se inyectaron oligos en el citoplasma de los cigotos en la etapa de pronúcleos. Los ratones se alojaron en rejillas estáticas en una instalación para animales convencional y se alimentaron a discreción con la dieta Teklad Global 2020X. Para el estudio de inyección de 5-Aza-dc, los ratones fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de ketamina/xilazina (100 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente), y se les administró un colirio analgésico de Proparacaína (0,5 %, Bausch & Lomb). A los animales se les inyectó por vía intraocular 1 µl de PBS en un ojo y 1 µl de 5-Aza-dc 2 µM disuelto en PBS en el ojo contralateral, cada dos semanas durante un período de 2 meses.

Los electroretinogramas (ERG) se realizaron siguiendo un protocolo informado anteriormente [36]. Brevemente, los ratones se adaptaron a la oscuridad durante 12 h, se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de ketamina/xilazina basada en el peso y se les dio una gota dilatadora de Tropicamida (1,5 %, Alcon), así como una gota de Proparacaína (0,5 %, Bausch & Lomb) como analgésico. Los ratones se examinaron con una configuración de cuenco Ganzfeld de campo completo (Diagnosys LLC), con electrodos colocados en cada córnea, con un electrodo de aguja de tierra subcutáneo colocado en la cola y un electrodo de referencia en la boca (Grass Telefactor, F-E2). El Lubricante (Goniosc 2,5 %, HUB Pharmaceuticals) se usó para proporcionar contacto de los electrodos con los ojos. La amplificación (a paso de banda de 1-1.000 Hz, sin filtrado de muesca), la presentación de estímulos y la adquisición de datos se programan y se realizan usando el sistema UTAS-E 3000 (LKC Technologies). Para ERG escotópico, la retina fue estimulada con una lámpara de xenón a -2 y -0,5 log cd·s/m². Para ERG fotópico, los ratones se adaptaron a una luz de fondo de 1 log cd·s/m² y la estimulación luminosa se fijó en 1,5 log cd·s/m². Las grabaciones se recopilaron y se promediaron en el software del fabricante (Veris, EDI) y se procesaron en Excel.

Análisis de retina de ratón.

Las retinas se recogieron inmediatamente después del sacrificio de los ratones, se fijó en paraformaldehído al 4 % durante 1 hora y se almacenó en PBS a 4 °C. Para inmunotinciones, las retinas se seccionaron, se montaron en diapositivas, a continuación se incubaron con BSA al 5 %, solución bloqueadora de PBS Triton-X al 0,1 % durante 1 hora. Los anticuerpos primarios (consulte la Tabla 2 para los anticuerpos usados en el estudio) se añadieron 1:50 en BSA PBS al 5 % y se incubaron a 4 °C durante 16 horas. Después del lavado 3x PBS, se añadieron anticuerpos secundarios 1:1000 en BSA PBS al 5 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación las muestras se lavaron 3x con PBS, se tiñó con DAPI durante 5 minutos a temperatura ambiente, se montó y se formaron imágenes (Keyence BZ-X700).

Tabla 1. Lista de cebadores usados en el estudio.

Comprobación de diana inespecífica	Secuencia (5' -> 3')	SECUENCIA
cr8 inespecífico D	GTAATTCCGTGATCACCGTC	SEQ ID NO:1
cr8 inespecífico I	CCAATAAATAACAGCAGAAG	SEQ ID NO:2
cr10 inespecífico D	CAATATGCTCATCATTGTCT	SEQ ID NO:3
cr10 inespecífico I	CCACACATGTCTACCTTCCT	SEQ ID NO:4
cebadores MeDIP		
prom. de hELOVL2 D	CGATTTGCAGGTCCAGCCG	SEQ ID NO:5
prom. de hELOVL2 I	CAGCGGGTGGGTATTCCTG	SEQ ID NO:6
prom. de hACTB D	CTAGGTGTGGACATCTCTTG	SEQ ID NO:7
prom. de hACTB I	TGCAGGAGCGTACAGAA	SEQ ID NO:8
prom. de mELOVL2 D	AGCTCCTCCGCTACTC	SEQ ID NO:9
prom. de mELOVL2 I	CCAGCCCTTGGTCATC	SEQ ID NO:10
prom. de mACTB D	TAGGCCCAGATGTACAGGAA	SEQ ID NO:11
Comprobación de diana inespecífica	Secuencia (5' -> 3')	SECUENCIA
prom. de mACTB I	CCAGAATGCAGGCCTAGTAA	SEQ ID NO:12
cebadores de qPCR		

hELOVL2 D	GCGGATCATGGAACATCTAA	SEQ ID NO:13
hELOVL2 I	CCAGCCATATTGAGAGCAGA	SEQ ID NO:14
hACTB D	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC	SEQ ID NO:15
hACTB I	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT	SEQ ID NO:16

TABLA 2. LISTA DE ANTICUERPOS USADOS EN EL ESTUDIO.

Inmunotinción	Empresa, N.º de Cat.	RRID
TEPC 15	Sigma M1421	AB_1163630
HtrA	Santa Cruz sc-377050	
C3	Santa Cruz sc-58926	AB_1119819
C5-b9	Santa Cruz sc-66190	AB_1119840
MeDIP		
5-metilcitosina	Millipore MABE146	AB_10863148
Transferencia Western		
ELOVL2	Santa Cruz sc-54874	AB_2262364
Histona H3	Cell Signaling 9715	AB_331563

REFERENCIAS

- 5
1. Glej, D. A. *et al.* Predicting Survival from Telomere Length versus Conventional Predictors: A Multinational Population-Based Cohort Study. *PLoS One* 11, e0152486 (2016).
- 10
2. Health, C. O. on S. and. Smoking and Tobacco Use; Surgeon General's Reports; 2004. Smoking and Tobacco Use Available at: http://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/sgr/2004/. (Accedido: 14 de noviembre de 2014)
3. Hannum, G. *et al.* Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Mol. Cell* 49, 359-367 (2013).
- 15
4. Gross, A. M. *et al.* Methylome-wide Analysis of Chronic HIV Infection Reveals Five-Year Increase in Biological Age and Epigenetic Targeting of HLA. *Mol. Cell* 62, 157-168 (2016).
5. Leonard, A. E. *et al.* Identification and expression of mammalian long-chain PUFA elongation enzymes. *Lipids* 37, 733-740 (2002).
- 20
6. Gregory, M. K., Cleland, L. G. y James, M. J. Molecular basis for differential elongation of omega-3 docosapentaenoic acid by the rat ELOVL5 and ELOVL2. *J. Lipid Res.* 54, 2851-2857 (2013).
- 25
7. Tikhonenko, M. *et al.* Remodeling of Retinal Fatty Acids in an Animal Model of Diabetes: A Decrease in Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids Is Associated With a Decrease in Fatty Acid Elongases ELOVL2 and ELOVL4. *Diabetes* 59, 219-227 (2010).
8. Bazan, N. G., Molina, M. F. y Gordon, W. C. Docosahexaenoic Acid Signalolipidomics in Nutrition: Significance in Aging, Neuroinflammation, Macular Degeneration, Alzheimer's, and Other Neurodegenerative Diseases. *Annu. Rev. Nutr.* 31, 321-351 (2011).
- 30
9. Agbaga, M.-P. *et al.* Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVLL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 12843-12848 (2008).
- 35
10. Harkewicz, R. *et al.* Essential Role of ELOVLL4 Protein in Very Long Chain Fatty Acid Synthesis and Retinal Function. *J. Biol. Chem.* 287, 11469-11480 (2012).
- 40
11. Beatty, S., Koh, H., Phil, M., Henson, D. y Boulton, M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 45, 115-134 (2000).
12. Hollyfield, J. G. *et al.* Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nat. Med.* 14, 194-198 (2008).

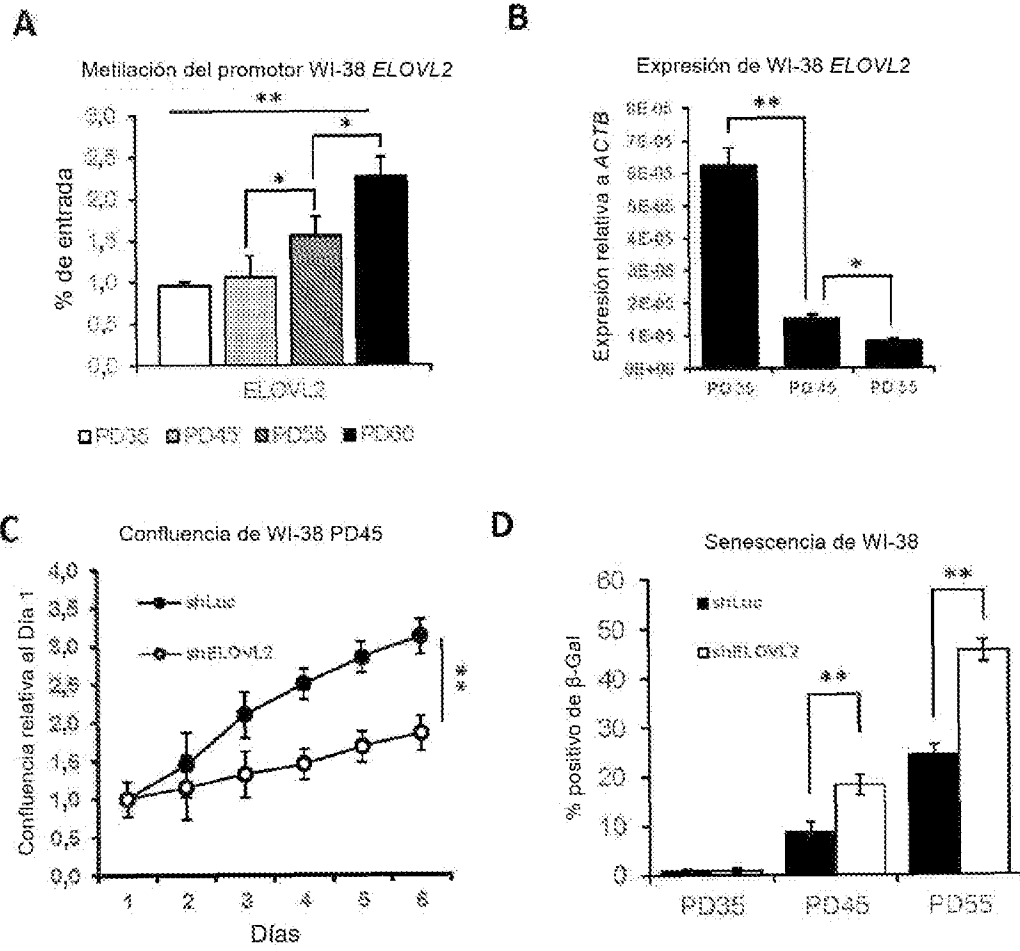
13. Curcio, C. A., Johnson, M., Huang, J.-D. y Rudolf, M. Apolipoprotein B-containing lipoproteins in retinal aging and age-related macular degeneration. *J. Lipid Res.* 51, 451-467 (2010).
- 5 14. Crabb, J. W. *et al.* Drusen proteome analysis: An approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 14682-14687 (2002).
15. Shaw, P. X. *et al.* Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J. Clin. Invest.* 105, 1731-1740 (2000).
- 10 16. Shaw, P. X. *et al.* Complement factor H genotypes impact risk of age-related macular degeneration by interaction with oxidized phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 109, 13757-13762 (2012).
17. Cameron, D. J. *et al.* HTRA1 variant confers similar risks to geographic atrophy and neovascular age-related macular degeneration. *Cell Cycle Georget. Tex* 6, 1122-1125 (2007).
- 15 18. Sivaprasad, S. y Chong, N. V. The complement system and age-related macular degeneration. *Eye* 20, 867 (2006).
- 20 19. Pignolo, R. J., Rotenberg, M. O. y Cristofalo, V. J. Alterations in contact and densitydependent arrest state in senescent WI-38 cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 30A, 471-476 (1994).
20. Schäuble, S. *et al.* Quantitative Model of Cell Cycle Arrest and Cellular Senescence in Primary Human Fibroblasts. *PLoS ONE* 7, e42150 (2012).
- 25 21. Jones, P. L. *et al.* Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 19, 187-191 (1998).
22. Momparler, R. L. Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin. Hematol.* 42, S9-16 (2005).
- 30 23. Swindell, W. R. *et al.* Indicators of 'Healthy Aging' in older women (65-69 years of age). A data-mining approach based on prediction of long-term survival. *BMC Geriatr.* 10, 55 (2010).
24. Xue, X. *et al.* Characterization of the fatty acyl elongase (ELOVL) gene family, and hepatic ELOVL and delta-6 fatty acyl desaturase transcript expression and fatty acid responses to diets containing camelina oil in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 175, 9-22 (2014).
- 35 25. Bartke, A. y Brown-Borg, H. Life extension in the dwarf mouse. *Curr. Top. Dev. Biol.* 63, 189-225 (2004).
- 40 26. Wang, T. *et al.* Epigenetic aging signatures in mice livers are slowed by dwarfism, calorie restriction and rapamycin treatment. *Genome Biol.* 18, 57 (2017).
27. Kolesnikov, A. V., Fan, J., Crouch, R. K. y Kefalov, V. J. Age-Related Deterioration of Rod Vision in Mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 11222-11231 (2010).
- 45 28. Zadavec, D. *et al.* ELOVL2 controls the level of n-6 28:5 and 30:5 fatty acids in testis, a prerequisite for male fertility and sperm maturation in mice. *J. Lipid Res.* 52, 245-255 (2011).
29. Garagnani, P. *et al.* Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. *Aging Cell* 11, 1132-1134 (2012).
- 50 30. Bacalini, M. G. *et al.* A meta-analysis on age-associated changes in blood DNA methylation: results from an original analysis pipeline for Infinium 450k data. *Aging* 7, 97-109 (2015).
- 55 31. Hayflick, L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614-636 (1965).
32. Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D. y Sedivy, J. M. Cellular senescence in aging primates. *Science* 311, 1257 (2006).
- 60 33. Röhme, D. Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts *in vitro* and erythrocytes *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 78, 5009-5013 (1981).
34. Wang, H. *et al.* One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell* 153, 910-918 (2013).
- 65 35. Bae, S., Park, J. y Kim, J.-S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-

target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 30, 1473-1475 (2014).

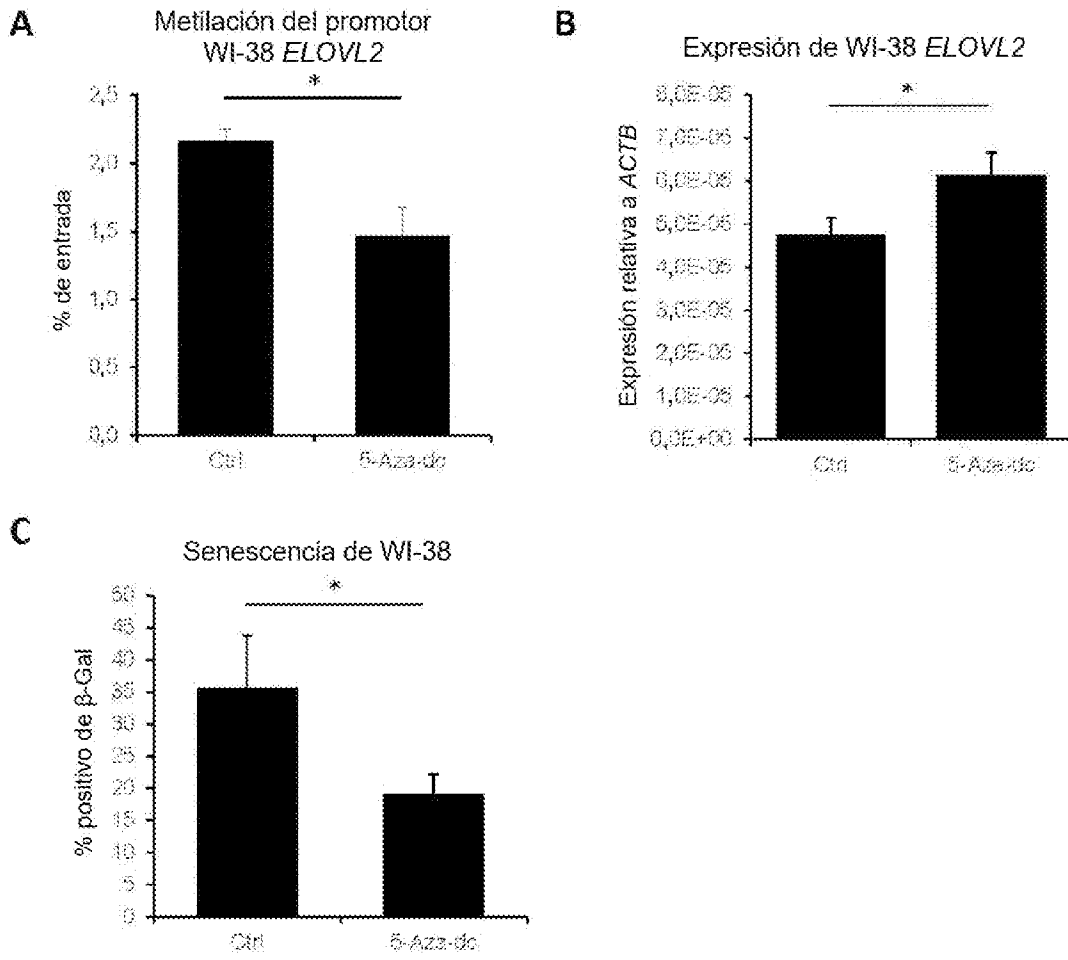
36. Luo, J. *et al.* Human retinal progenitor cell transplantation preserves vision. *J. Biol. Chem.* 289, 6362-6371 (2014).

REIVINDICACIONES

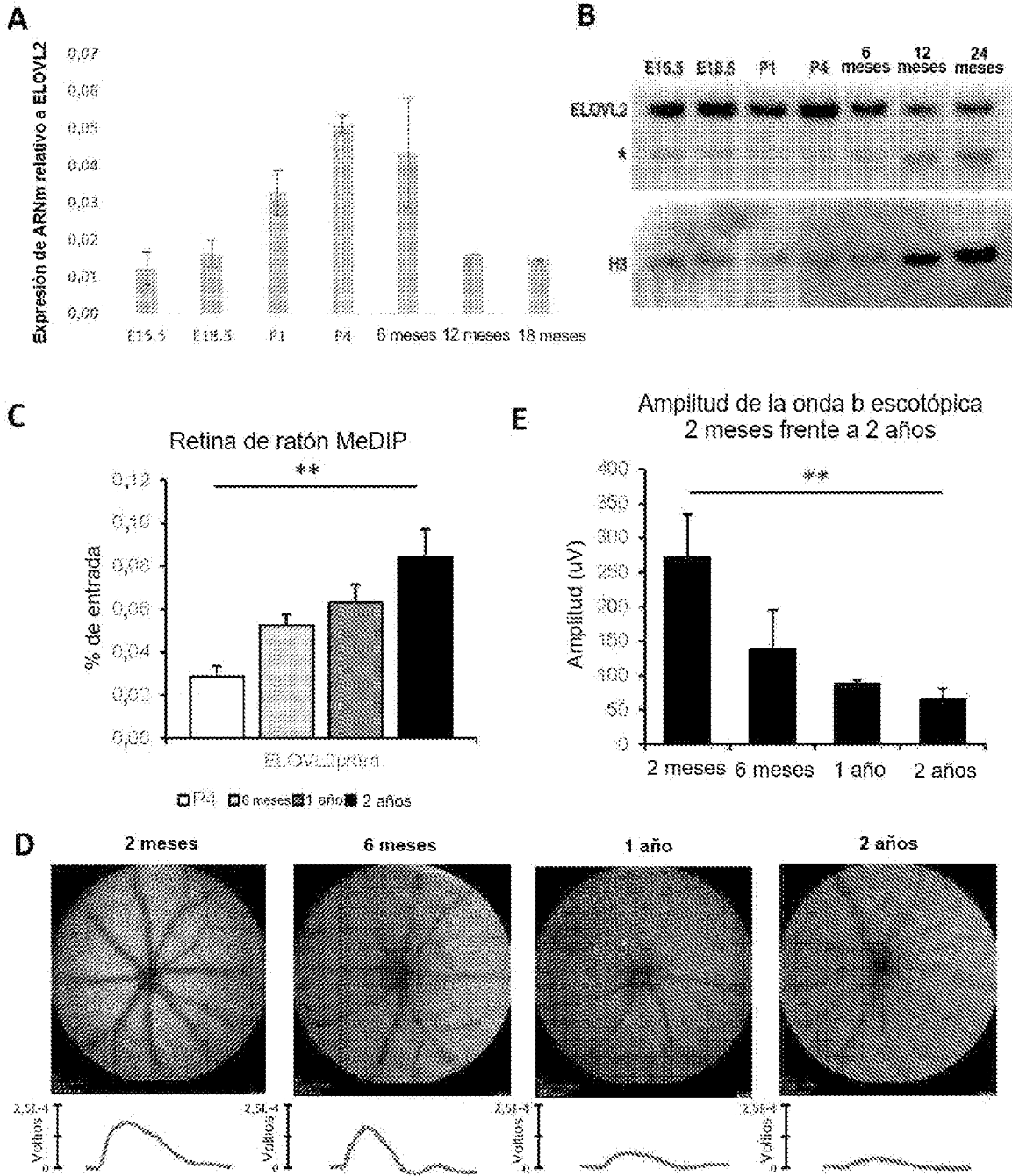
- 5 1. Una preparación que comprende un vector vírico que codifica una proteína o un polipéptido ELOVL2 para su uso en un método para seleccionar un paciente que necesita tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad y tratar la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) en el paciente, en donde el vector vírico es adecuado para la administración a un sujeto humano y en un excipiente adecuado para la administración a un sujeto humano.
- 10 2. La preparación que comprende un vector vírico que codifica la proteína o el polipéptido ELOVL2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el vector vírico comprende un promotor o un potenciador, opcionalmente en donde el vector vírico comprende un promotor constitutivo o inducible.
- 15 3. La preparación que comprende un vector vírico que codifica la proteína o el polipéptido ELOVL2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el vector vírico comprende un promotor constitutivo.
- 20 4. La preparación que comprende un vector vírico que codifica la proteína o el polipéptido ELOVL2 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el vector vírico se administra al ojo mediante una vía intravítrea, subretiniana, subconjuntival, subtenoniana o yuxtaescleral posterior.
5. La preparación que comprende un vector vírico que codifica la proteína o el polipéptido ELOVL2 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el vector vírico se selecciona de un vector adenovírico, un vector de virus adenoasociado, un vector lentivírico, un vector del virus vaccinia y un vector retrovírico.



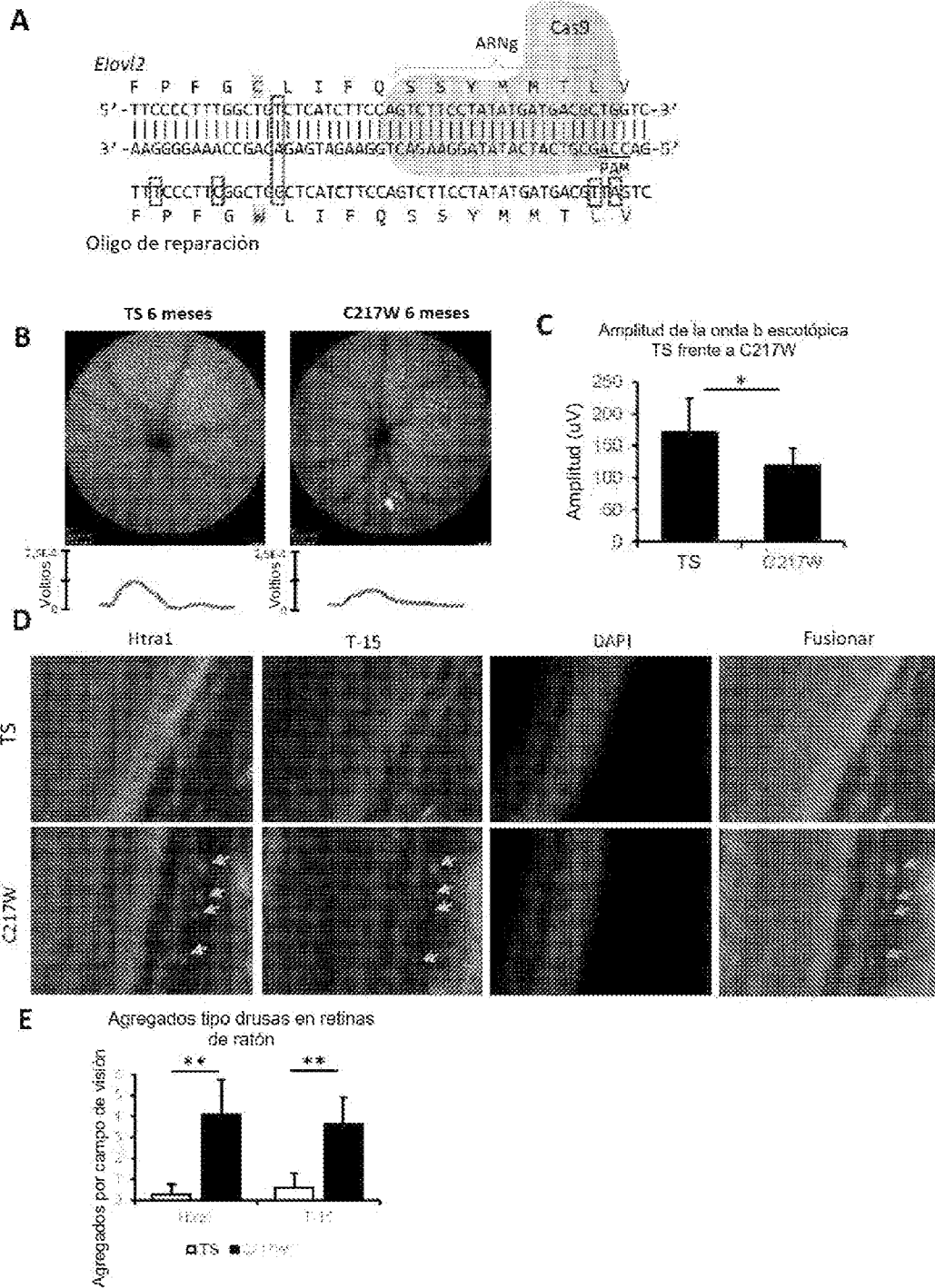
FIGURAS 1A-1D



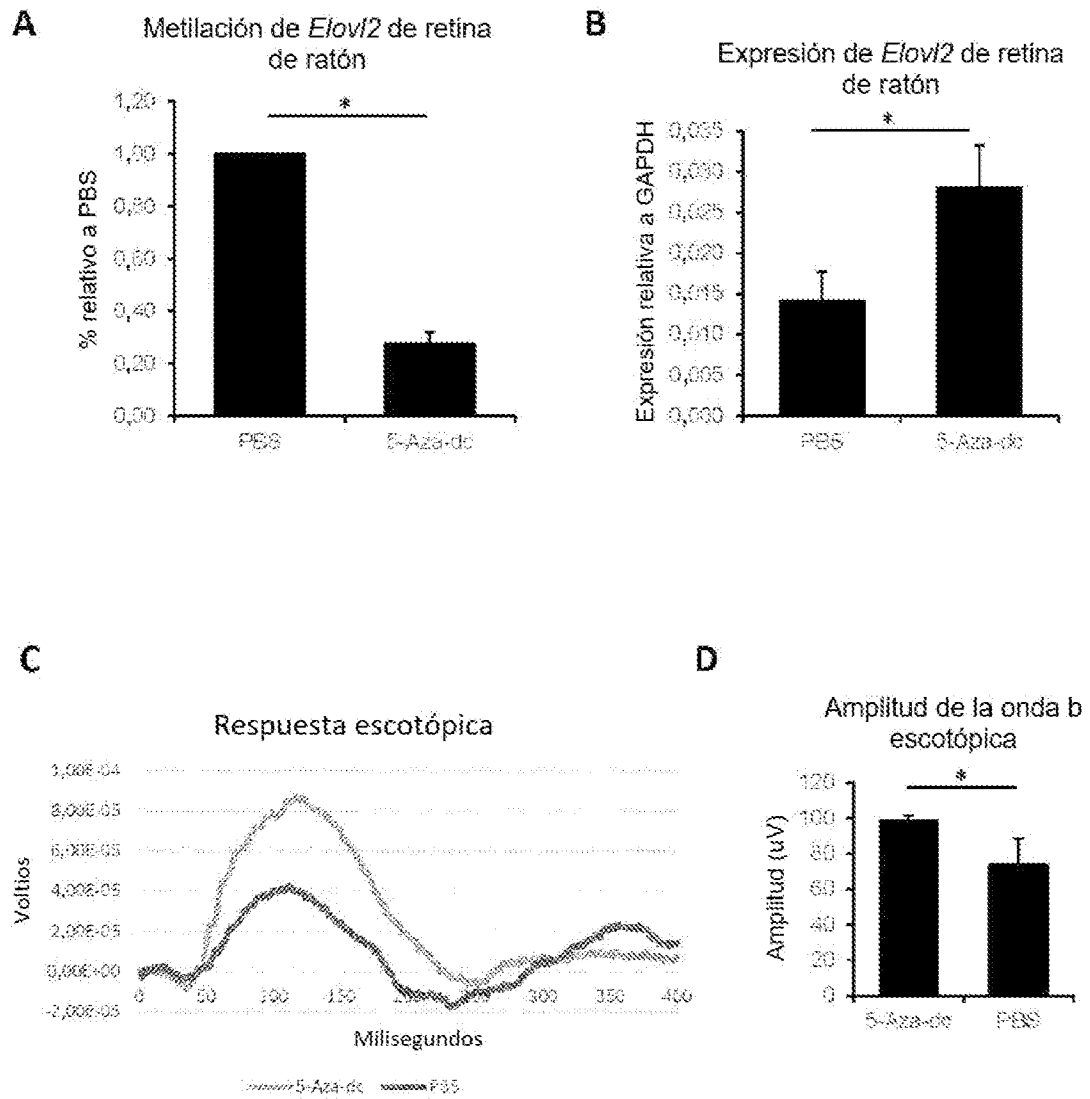
FIGURAS 2A-2C



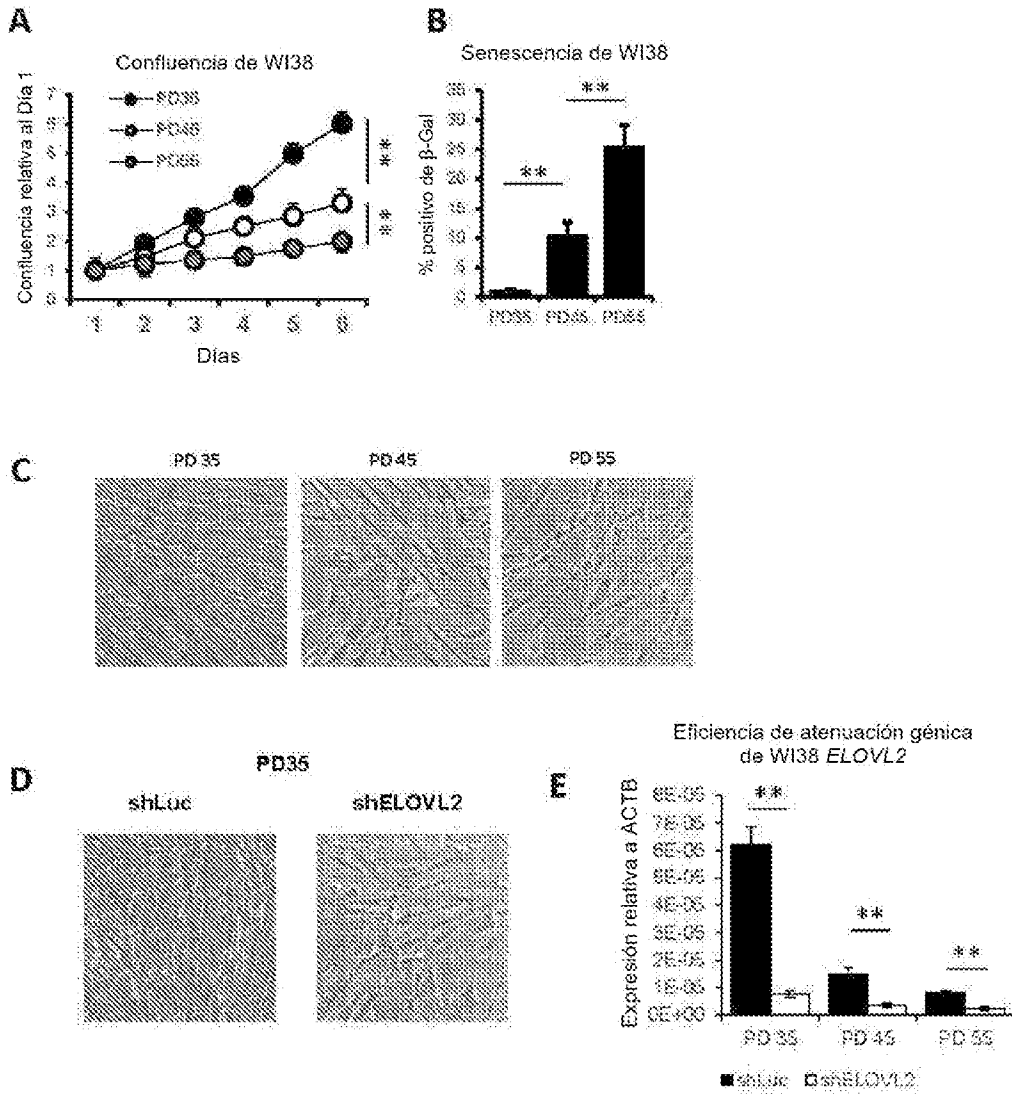
FIGURAS 3A-3E



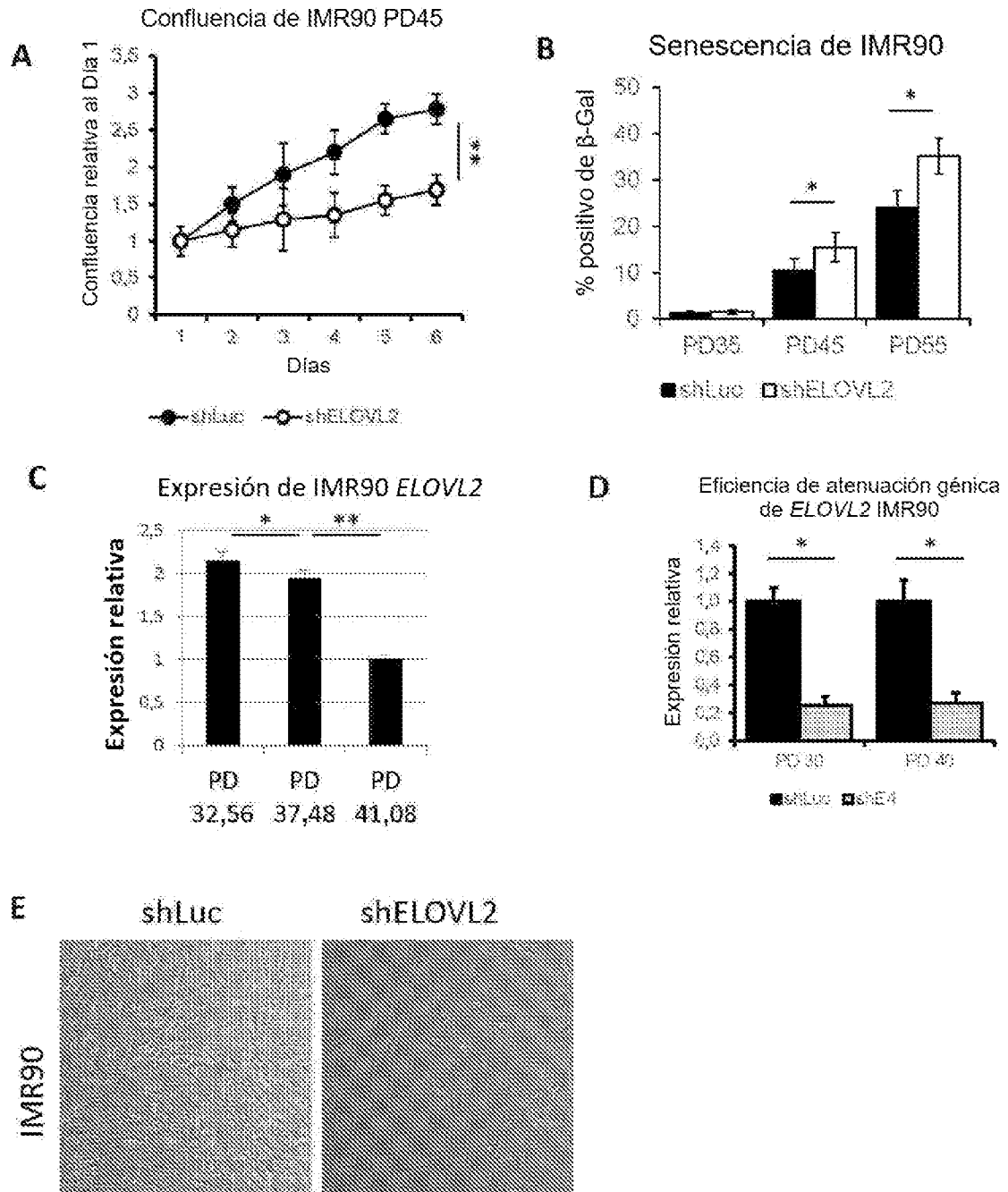
FIGURAS 4A-4E



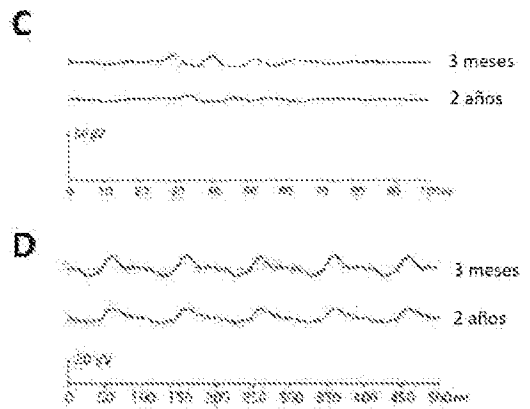
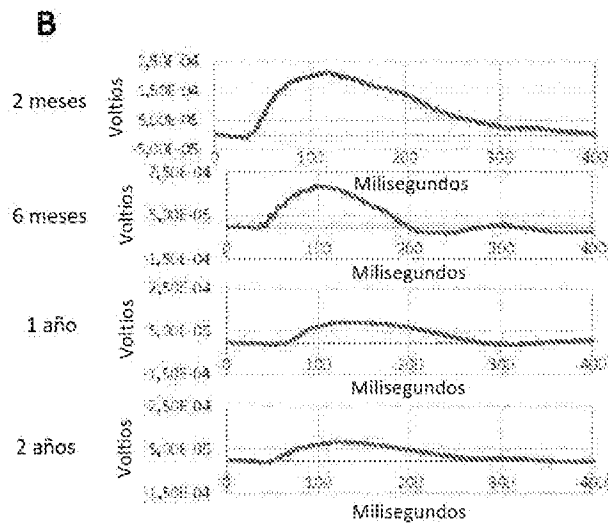
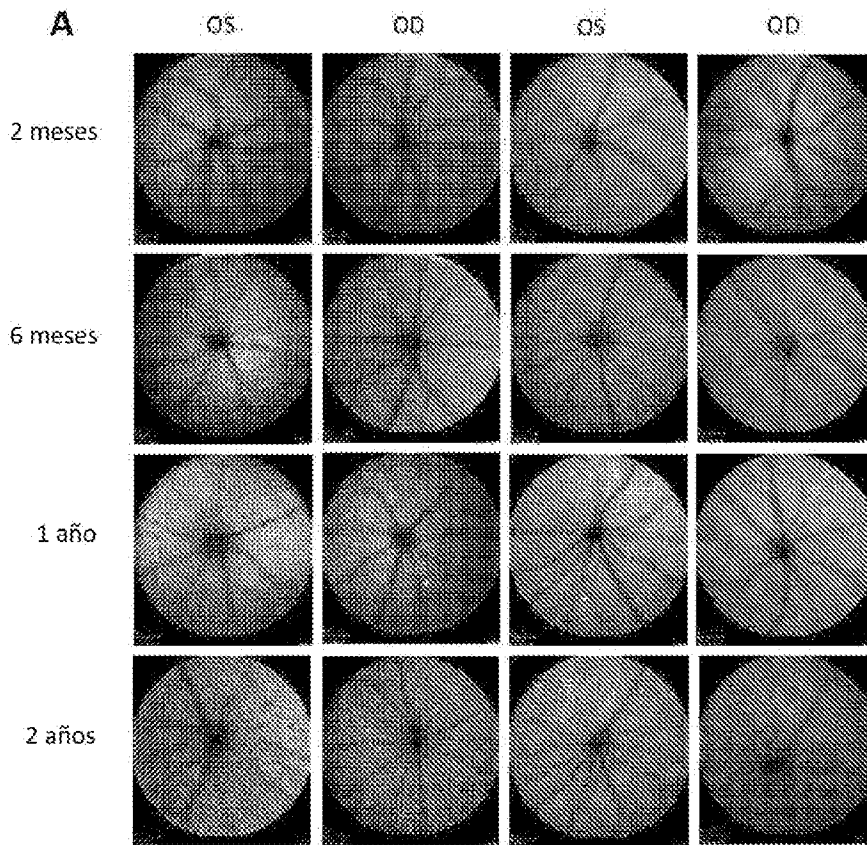
FIGURAS 5A-5D



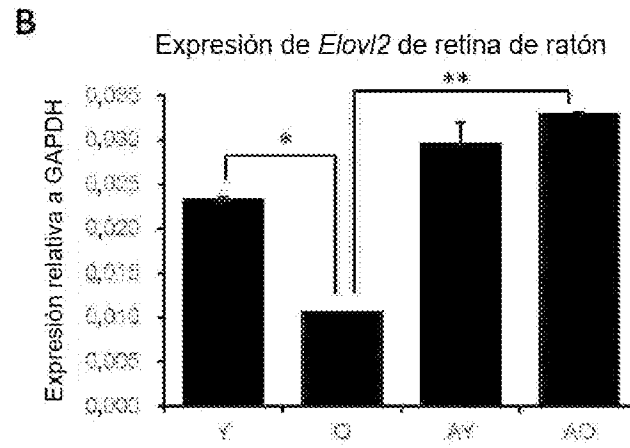
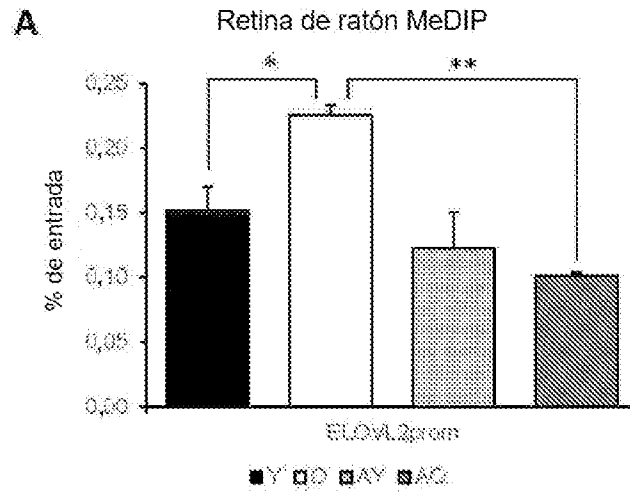
FIGURAS 6A-6E



FIGURAS 7A-7E



FIGURAS 8A-8B



FIGURAS 9A-9B

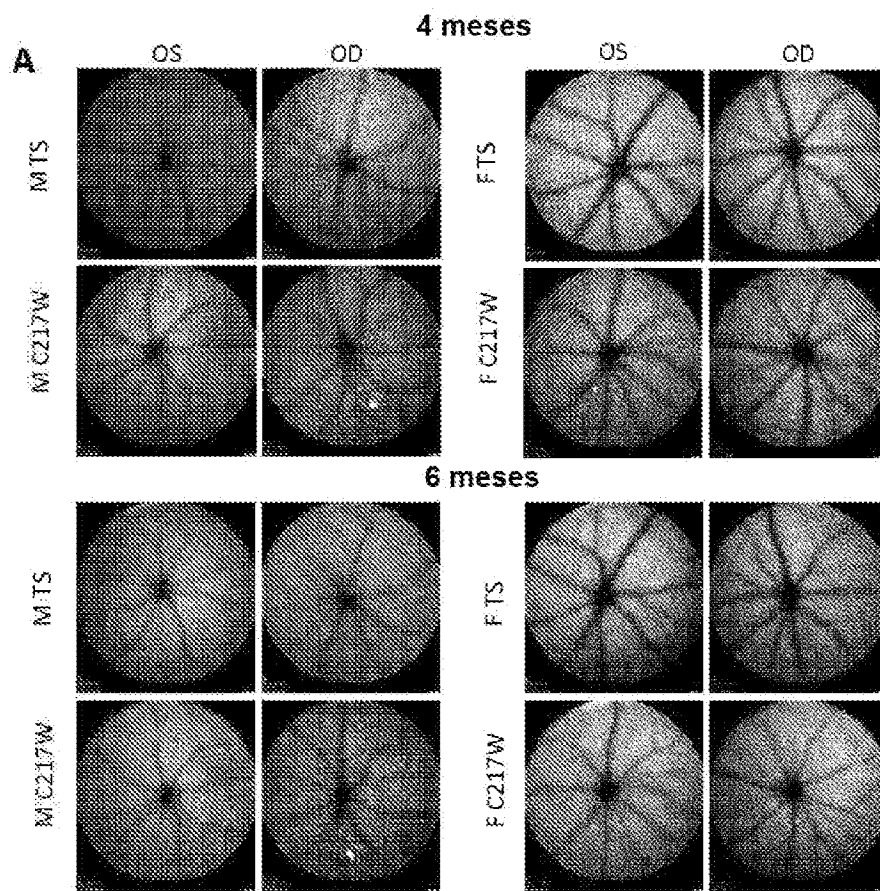


FIGURA 11A

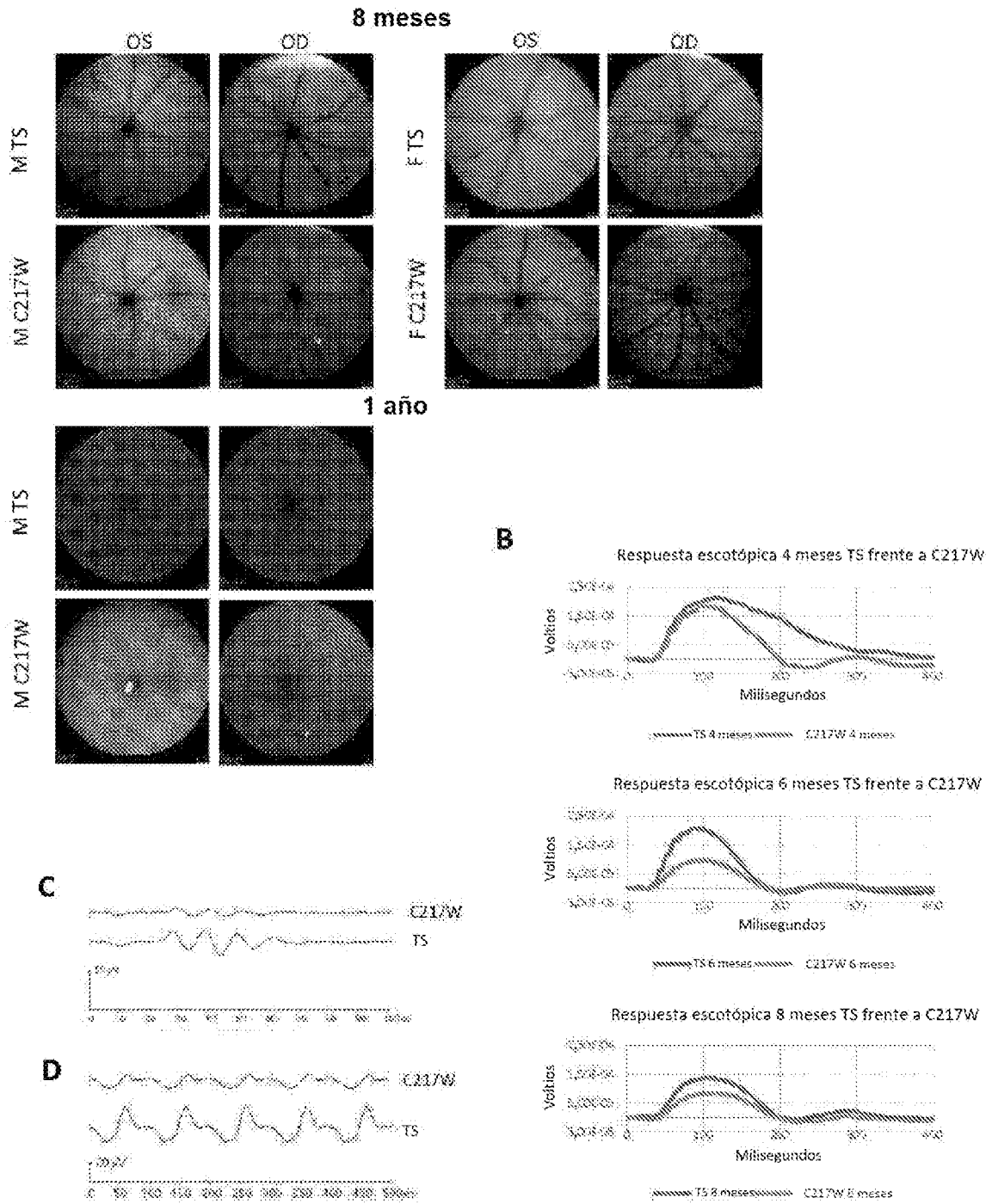


FIGURA 11A (Cont.)-11D

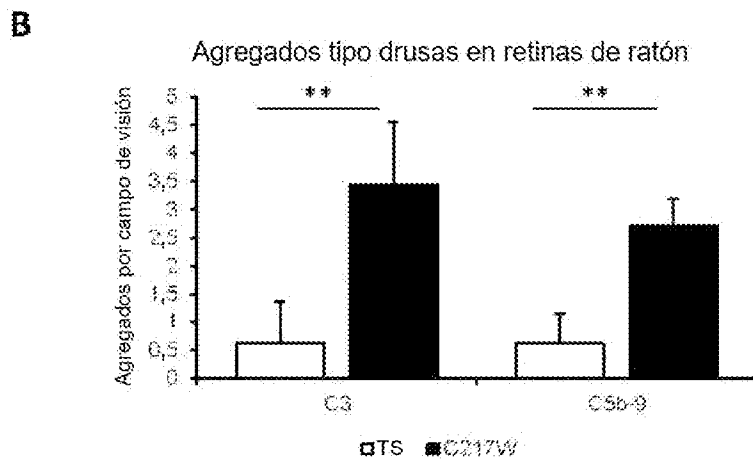
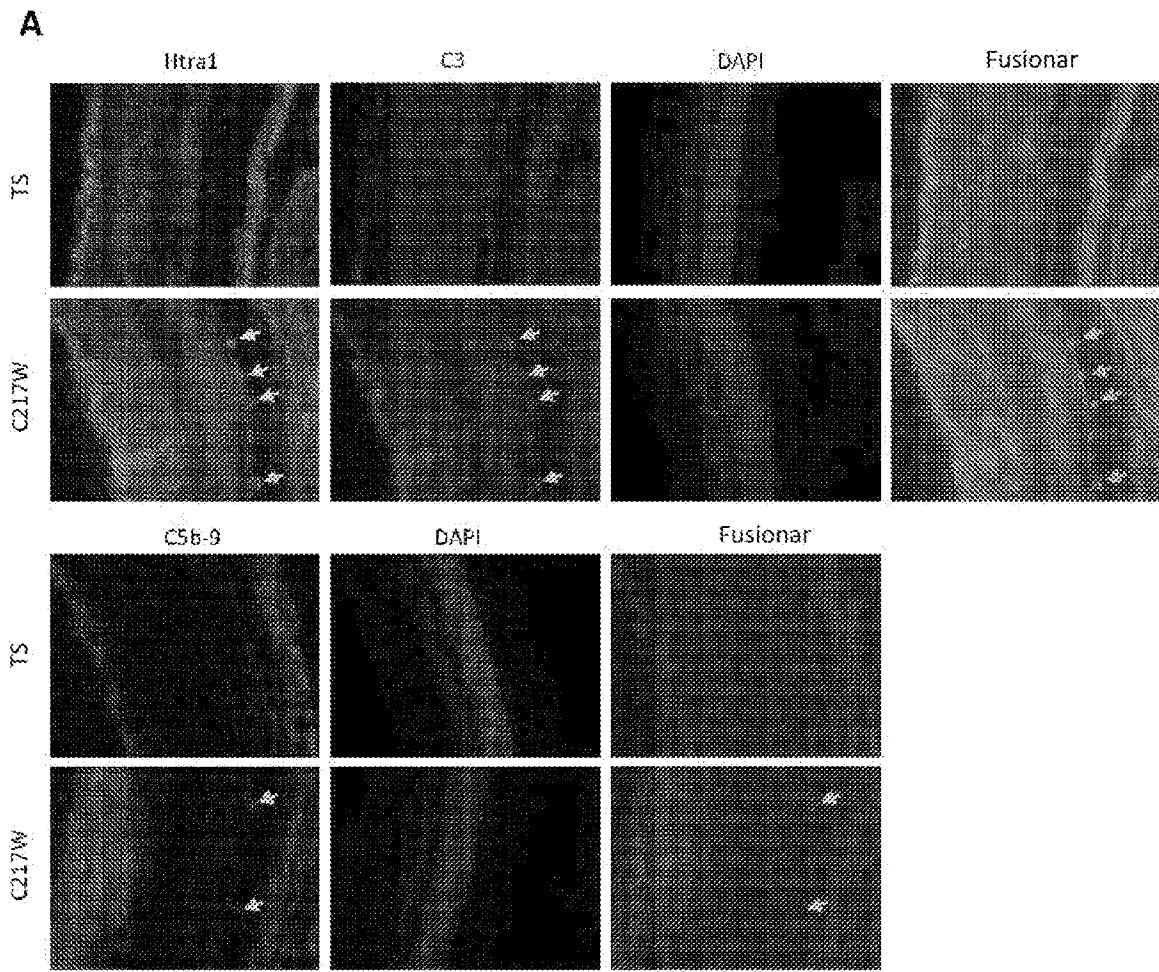


FIGURA 12A-12B

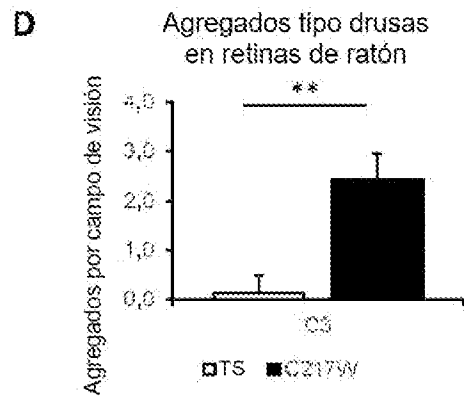
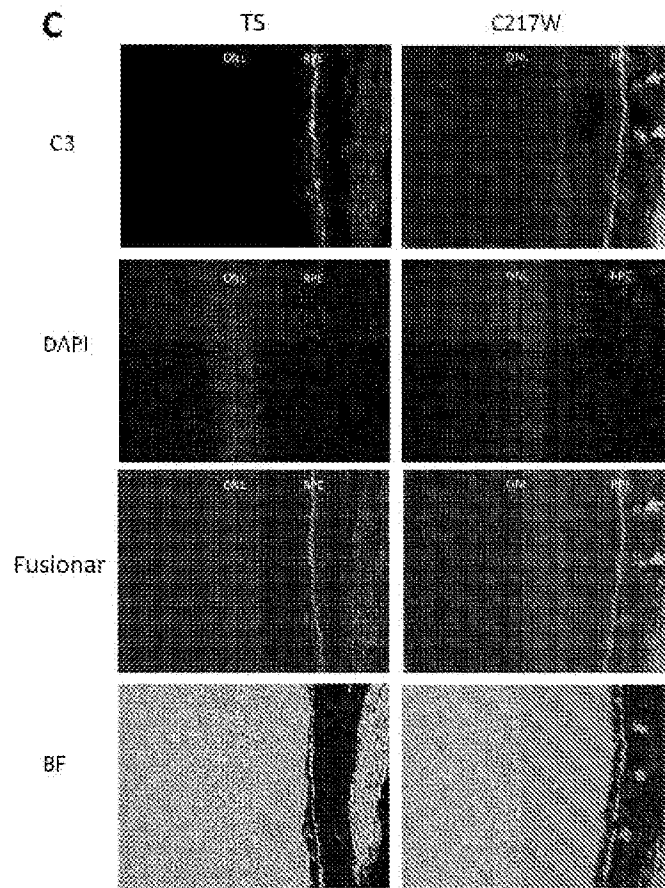


FIGURA 12C-12D

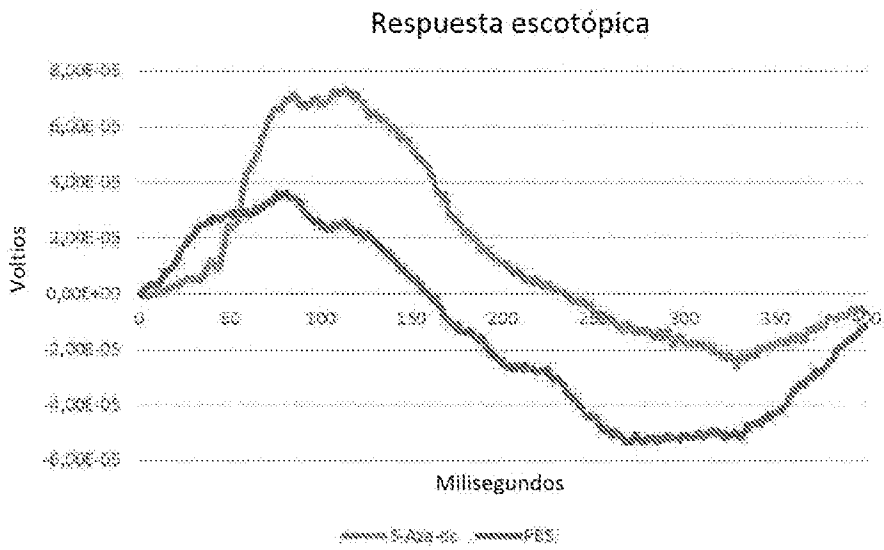
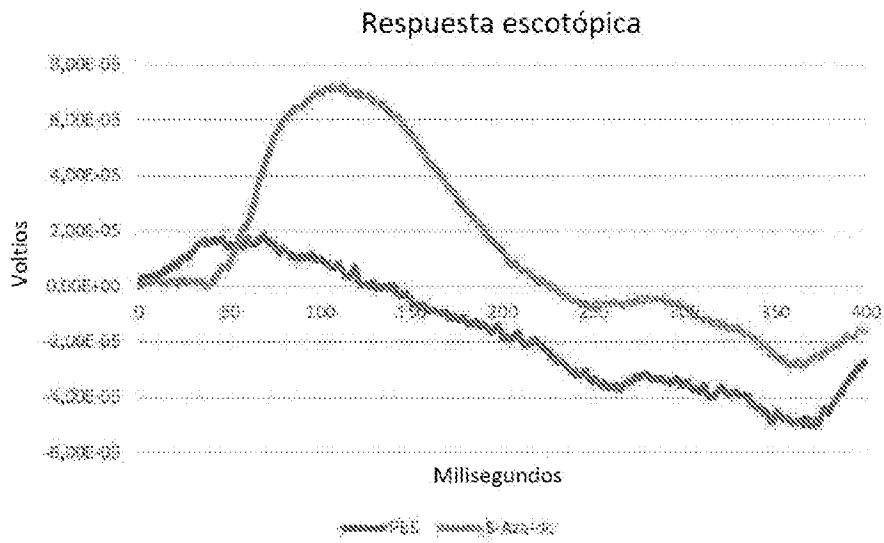


FIGURA 13